



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

« ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΤΕΜΑΧΙΣΜΟ

ΤΟΥ Χ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ CRISPR

ΣΤΟ ΔΑΚΟ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ»



Κυριαζοπούλου Ελένη

Λάρισα

2023

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

« ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΤΕΜΑΧΙΣΜΟ ΤΟΥ Χ
ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ CRISPR ΣΤΟ
ΔΑΚΟ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ»

« CONSTRUCT GENERATION FOR SHREDDING OF THE X
CHROMOSOME THROUGH CRISPR SYSTEM IN THE OLIVE
FRUIT FLY»

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας την ακαδημαϊκή χρονιά 2019-2020, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Μαθιόπουλου Κωνσταντίνου και της μεταδιδακτορικής ερευνήτριας Δρ Τσουμάνη Κωνσταντίνας.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Γιακουντής Αντώνιος: Επίκουρος Καθηγητής Γονιδιωματικής και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περίληψη

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, αποτελεί το πιο σημαντικό παράσιτο των ελαιόδεντρων παγκοσμίως. Η διαχείρισή του στηρίζεται αυτή τη στιγμή στη χρήση χημικών εντομοκτόνων, των οποίων οι δυσμενείς συνέπειες καθιστούν αναγκαία την εύρεση νέων αποτελεσματικών μεθόδων ελέγχου. Μια υποσχόμενη μοριακή μέθοδος αντιμετώπισής του είναι το σύστημα τεμαχισμού του Χ χρωμοσώματος (X-shredding), η οποία παρεμβαίνει στο μηχανισμό φυλοκαθορισμού υπέρ των αρσενικών και αποσκοπεί στη δημιουργία πλεονάσματος αρσενικών ατόμων και κατά συνέπεια την μείωση του πληθυσμού λόγω έλλειψης θηλυκών.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο σχεδιασμός και η δημιουργία των κατάλληλων γενετικών κατασκευών ώστε η χρήση τους να επιτρέψει την εφαρμογή του συστήματος X-shredding στο δάκο της ελιάς. Συγκεκριμένα, σχεδιάστηκαν δύο φορείς μετασχηματισμού piggyBac για κάθε μια από τις νουκλεάσες Cas9 και Cpf1 αντίστοιχα του συστήματος CRISPR/Cas, οι οποίοι φέρουν όλες τις απαραίτητες αλληλουχίες για το γενετικό μετασχηματισμό του *B. oleae* και τον τεμαχισμό του Χ χρωμοσώματος του εντόμου κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης. Οι γενετικές κατασκευές που ενσωματώθηκαν στους φορείς αυτούς περιλαμβάνουν μια ενδονουκλεάση CRISPR, το σταθερό τμήμα του gRNA (scaffold) και τον δείκτη μετασχηματισμού dsRed, υπό τον έλεγχο κατάλληλων ειδο-ειδικών υποκινητών για την έκφραση των παραπάνω στοιχείων, καθώς και τα άκρα 5' και 3' του φορέα piggyBac.

Μελλοντικές προσεγγίσεις θα εστιάσουν στην επιλογή των κατάλληλων αλληλουχιών-στόχων του Χ χρωμοσώματος ώστε να παραχθούν τα αντίστοιχα συνθετικά sgRNAs ανά περίπτωση και να κλωνοποιηθούν στους φορείς μετασχηματισμού. Η επακόλουθη μεταφορά τους σε έμβρυα δάκου μέσω μικροενέσεων αναμένεται να οδηγήσει σε παραμόρφωση της αναλογίας φύλου υπέρ των αρσενικών και τελικά στη δημιουργία αποκλειστικά αρσενικών διαγονιδιακών μυγών.

Abstract

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, is the most important pest of olive trees worldwide. Its management is currently based on the use of chemical insecticides, with adverse effects rendering necessary the development of new effective control methods. A promising molecular control technique is the X chromosome shredding system (X-shredding), which interferes in the sex determination system in favor of males inducing an extreme male-biased offspring, thus leading to decreased pest population size due to the lack of females.

The aim of the present study was to design and generate appropriate genetic constructs that will enable the application of the X-shredding system in the olive fruit fly. Specifically, two transformation vectors for each of the Cas9 and Cpf1 nucleases of the CRISPR/Cas system respectively were designed, which carry all the essential sequences for the genetic transformation of *B. oleae* and the X chromosome destruction during spermatogenesis. The genetic constructs cloned in these vectors carry a CRISPR endonuclease, the gRNA constant region (scaffold) and the dsRed transformation marker, under the control of suitable species-specific promoters, as well as and the piggyBac's 5' and 3' terminal repeats..

Future approaches will focus on the selection of appropriate X-specific target sequences to produce the corresponding synthetic sgRNAs based on each nuclease used and clone them into the respective transformation vector. Their subsequent transfer to the olive flies embryos via microinjections is expected to lead to the distortion of the sex ratio of the next generations towards the males and eventually to male-only transgenic flies.

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ματθιόπουλο και τον κ. Γιακουντή που με δέχθηκαν στο εργαστήριο καθώς και την κ. Παπαδοπούλου που δέχθηκε να αποτελέσει μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω φυσικά στην Δρ Κωνσταντίνα Τσουμάνη για την καθοδήγηση μέσα στο εργαστήριο, για την υπομονή της, για τη βοήθεια κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων και για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε κατά τη συγγραφή της εργασίας. Έχοντας βιώσει από κοντά το πάθος και την αγάπη της για την επιστήμη, είμαι σίγουρη πως δεν θα μπορούσε να ασχοληθεί με κάτι άλλο που να της ταιριάζει περισσότερο. Ωστόσο, ο θαυμασμός μου για αυτή δεν περιορίζεται μόνο στην ιδιότητά της ως επιστήμονας αλλά και ως άνθρωπος.

Οι μέρες και οι ώρες που πέρασα στο εργαστήριο αποτέλεσαν τις πιο όμορφες που έχω περάσει στο Τμήμα Βιοχημείας και για αυτό ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα.

Αν και η εκπόνηση αυτής της εργασίας έγινε το ακαδημαϊκό έτος 2019-2020, η συγγραφή της έγινε το 2023. Αυτό το διάστημα υπήρξε δύσκολο, συνοδευτήκε από κλάματα, αισθήματα ντροπής και απόγνωσης ωστόσο στο τέλος υπήρξε καθοριστικό για να ανακαλύψω τον εαυτό μου και το τι θέλω να κάνω. Η συγγραφή και η παράδοση της εργασίας αποτελεί το τελευταίο κομμάτι του παζλ που ονομάζεται Βιοχημεία και θα ήταν κρίμα να μην το ολοκληρώσω. Για αυτό ευχαριστώ πολύ τους δικούς μου ανθρώπους, κυρίως τους γονείς μου, τους συγγενείς και φίλους μου για την αγάπη, την στήριξη, την κατανόηση και την ώθησή τους να μην τα παρατήσω.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	7
1.1 Διαχείριση εντόμων.....	7
1.2 Μέθοδος SIT.....	7
1.3 Μέθοδος RIDL.....	8
1.4 Μέθοδος τεμαχισμού Χ χρωμοσώματος.....	9
1.5 Σύγκριση SIT/RIDL/X-shredding.....	10
1.6 Προϋποθέσεις για την ανάπτυξη του συστήματος Χ-shredding.....	10
1.6.1 ΧΥ φυλοκαθορισμός.....	11
1.6.2 Τεχνολογία γενετικού μετασχηματισμού.....	12
1.6.3 Redkmer.....	13
1.6.4 Το σύστημα CRISPR/Cas.....	15
1.6.4.1 Ενδονουκλεάση Cas9.....	16
1.6.4.2 Ενδονουκλεάση Cpf1.....	18
1.6.4.3 Διαφορές Cas9 & Cpf1.....	18
1.6.5 Υποκινητές λειτουργικοί κατά τη σπερματογένεση	20
1.7 Ο δάκος της ελιάς	20
2. Σκοπός.....	23
3. Υλικά και Μέθοδοι	24
3.1 Μέθοδοι ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων.....	24
3.1.1 Συμβατική PCR.....	24
3.1.2 Overhang PCR.....	26
3.2 Τεχνικές κλωνοποίησης.....	27

3.2.1 Μετασχηματισμός βακτηρίων.....	28
3.2.2 Στερεή καλλιέργεια.....	28
3.2.3 Υγρή καλλιέργεια.....	29
3.2.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (mini preps).....	30
3.2.5 Πέψη φορέα με ένζυμα περιορισμού.....	31
3.2.6 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA (Ligation).....	32
3.3 Τεχνικές χειρισμού νουκλεϊκών οξέων.....	33
3.3.1 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	33
3.3.2 Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης (Gel extraction).....	34
3.3.3 Ποσοτικοποίηση DNA-Quawell UV Spectrophotomer.....	36
3.4 Βιοπληροφορικές μέθοδοι.....	37
3.4.1 Benchling.....	37
3.4.2 IDT Primer Quest Tool.....	37
3.4.3 Oligoanalyzer Tool.....	37
4. Αποτελέσματα.....	39
4.1 Πειραματικός σχεδιασμός.....	39
4.2 Πειραματικά αποτελέσματα.....	41
4.2.1 Cas9.....	41
4.2.2 Cpf1.....	45
5. Συζήτηση.....	49
6. Παράρτημα.....	52
7. Βιβλιογραφία.....	54

1. Εισαγωγή

1.1 Διαχείριση εντόμων

Τα έντομα επηρεάζουν τη ζωή και την ευημερία των ανθρώπων με πολλούς τρόπους, επειδή είτε αποτελούν φορείς μεταδοτικών ασθενειών είτε είναι έντομα αγρονομικού ενδιαφέροντος που προκαλούν οικονομικές και υλικές απώλειες στην αγροτική παραγωγή. Η αντιμετώπιση τους βασίζεται κυρίως σε χημικά εντομοκτόνα, τα οποία παρουσιάζουν αρκετά μειονεκτήματα επειδή επηρεάζουν την δημόσια υγεία καθώς και ωφέλιμα έντομα. Η συνεχής χρήση τους οδηγεί σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας των πληθυσμών των εντόμων καθιστώντας τα αναποτελεσματικά.

Συνεπώς είναι επιτακτική η ανάγκη εύρεσης νέων εργαλείων για την καταπολέμηση των εντόμων που να είναι φιλικά προς το περιβάλλον και να έχουν μια πιο μακροπρόθεσμη βιωσιμότητα. Ο γενετικός έλεγχος είναι μια εναλλακτική μέθοδος για τον έλεγχο των εντόμων βασισμένος στην ελεγχόμενη απελευθέρωση στείρων εντόμων, τα οποία ανταγωνίζονται για σύζευξη με τα έντομα αγρίου τύπου με σκοπό τη μείωση των πληθυσμών λόγω μη γόνιμων διασταυρώσεων (Knipling, 1955). Η αρχική μέθοδος που βασίστηκε στη στείρωση με ακτινοβολία, ενισχύθηκε τα επόμενα χρόνια με την εφαρμογή προσεγγίσεων κλασικής γενετικής, ενώ πλέον η ανάπτυξη νέων μοριακών προσεγγίσεων και η χρήση της γενετικής μηχανικής έδωσε τη δυνατότητα ανάπτυξης διαγονιδιακών τεχνολογιών για την καταστολή ενός πληθυσμού εντόμων. Σε κάθε περίπτωση αυτός ο τύπος ελέγχου είναι είδο-ειδικός, μη τοξικός και έχει το πλεονέκτημα πως τα ίδια τα απελευθερωμένα έντομα προκαλούν τη μείωση του πληθυσμού.

1.2 Μέθοδος SIT

Η τεχνική στείρου εντόμου (Sterile Insect Technique, SIT), είναι μια προσέγγιση φιλική προς το περιβάλλον και ειδική για το έντομο ενδιαφέροντος που πρωτοεφαρμόστηκε στην κοχλιόμυγα ενώ ακολούθησαν πολλές επιτυχημένες εφαρμογές και σε άλλα έντομα. Η τεχνική βασίζεται στην μαζική εργαστηριακή εκτροφή εντόμων και την επακόλουθη στείρωσή τους με ακτινοβολία γ, με στόχο την μείωση του πληθυσμού μετά από συνεχείς απελευθερώσεις μεγάλου αριθμού αυτών των στείρων εντόμων σε μια δεδομένη περιοχή (Knipling, 1955). Στην SIT κυρίαρχες θνησιγενείς μεταλλάξεις παράγονται με τη χρήση της ακτινοβολίας και η επιτυχία της μεθόδου κρίνεται από το βαθμό αποτελεσματικής σύζευξης μεταξύ των στείρων αρσενικών και των θηλυκών άγριου τύπου (Robinson, 1983).

Προσαρμόζοντας τη δόση των μεταλλαξιγόνων και τις εφαρμοζόμενες διαδικασίες, οι ερευνητές στοχεύουν να πετύχουν ένα βαθμό χρωμοσωμικής θραύσης στους αρσενικούς γαμέτες, ο οποίος θα διακόψει την ανάπτυξη του εμβρύου ή θα οδηγήσει σε στειρότητα των απογόνων. Η δόση που θα δώσει τα παραπάνω αποτελέσματα δεν πρέπει να προκαλέσει απώλεια στην ικανότητα σύζευξης των αρσενικών, ούτε αλλαγή στη βιωσιμότητα του σπέρματος (Gould and Schliekelman, 2003).

Η αποτελεσματική απομάκρυνση των θηλυκών πριν την απελευθέρωση των στείρων στο πεδίο είναι επικερδής και σε κάποιες περιπτώσεις απαραίτητη, αφού τα στείρα θηλυκά εξακολουθούν να ωοαποθέτουν και να προκαλούν ζημιά και απώλεια σοδειάς. Ακόμη ο διαχωρισμός του απελευθερωμένου πληθυσμού απαιτείται όταν τα φύλα έχουν διαφορετική ευαισθησία στην ακτινοβολία και η δόση για τη στέρωση των θηλυκών είναι βλαβερή για τη φυσική κατάσταση των αρσενικών. Επιπλέον υπάρχουν και οικονομικά οφέλη αφού στη μαζική εκτροφή το κόστος των θηλυκών είναι ίδιο με των αρσενικών. Η απομάκρυνσή τους σε ένα αρχικό στάδιο της ανάπτυξης μπορεί να μειώσει το κόστος εκτροφής και διατήρησης του πληθυσμού. Άρα, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη ενός συστήματος διαχωρισμού φύλου (sexing system) πριν την απελευθέρωση (Robinson, 1983).

Άλλες τεχνικές γενετικού ελέγχου που ερευνήθηκαν τις δεκαετίες του 1960 και του 1970 ώστε να βελτιώσουν την απόδοση της SIT είναι η υβριδική στειρότητα (hybrid sterility), η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα (cytoplasmic incompatibility), μετατοπίσεις (translocations) και υπολειπόμενα θνησιγόνα χαρακτηριστικά (conditional lethal traits) (Whitten, 1985).

1.3 Μέθοδος RIDL

Μια διαγονιδιακή εκδοχή της SIT που αναπτύχθηκε είναι η απελευθέρωση εντόμων που φέρουν ένα επικρατές θνησιγόνο γονίδιο (Release of Insects carrying a Dominant Lethal, RIDL) δηλαδή το έντομο στόχος φέρει ένα επικρατές φυλοειδικό υπό όρους θνησιγόνο. Η συνθήκη που θα ενεργοποιήσει το θνησιγόνο γονίδιο δεν εντοπίζεται φυσιολογικά στον άγριο πληθυσμό, αλλά δημιουργείται μόνο στο εργαστήριο. Το σύστημα αυτό αναπτύχθηκε για πρώτη φορά στη *Drosophila melanogaster* στην οποία ένα επικρατές θνησιγόνο γονίδιο ειδικό για τα θηλυκά εκφράζεται μόνο με την απουσία της τετρακυκλίνης στη διατροφή (Thomas et al., 2000). Ωστόσο, η συγκεκριμένη προσέγγιση παρουσίαζε περιορισμούς στην εφαρμογή σε άλλα έντομα εκτός της *D. melanogaster* λόγω έλλειψης συστημάτων έκφρασης ικανά να παρέχουν θηλεο-ειδική έκφραση σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια. Ως εξέλιξη της αναπτύχθηκε ένα εναλλακτικό σύστημα RIDL που θα προκαλεί επιλεκτική θηλεο-ειδική θνησιμότητα (female specific Release of Insects carrying Dominant Lethal, fsRIDL) (Fu et al., 2007), χρησιμοποιώντας ένα σύστημα φυλο-ειδικού εναλλακτικού ματίσματος που εξασφαλίζει την έκφραση του θνησιγόνου γονιδίου αποκλειστικά στα θηλυκά, χωρίς την ανάγκη ύπαρξης ειδικού υποκινητή για τα θηλυκά.

1.4 Μέθοδος τεμαχισμού του X χρωμοσώματος

Μια άλλη εναλλακτική ειδο-ειδική προσέγγιση που παρεμβαίνει στο μηχανισμό φυλοκαθορισμού υπέρ των αρσενικών και αποσκοπεί επίσης στην παραγωγή αρσενικών αποκλειστικά ατόμων αποτελεί το σύστημα του τεμαχισμού του X χρωμοσώματος ή X-shredding. Η ιδέα βασίστηκε στην υπόθεση του Hamilton το 1967 ότι ένα ετερογαμετικό είδος θα είχε όλο και περισσότερη κλίση προς τα αρσενικά εάν σε κάθε γενιά ένα μεταλλαγμένο Y χρωμόσωμα ευνοούσε την μετάδοση του σε σχέση με το X χρωμόσωμα. Δηλαδή μια προσοδευτική μείωση στην αναλογία των θηλυκών σε έναν πληθυσμό θα προκαλούσε μείωση στο μέγεθος του πληθυσμού ή και σε ακραίες περιπτώσεις την εξαφάνιση του, αφού ο αριθμός και η παραγωγικότητα των θηλυκών καθορίζει το μελλοντικό μέγεθος ενός πληθυσμού (Hamilton, 1967). Παρατηρήθηκε ότι στο *Aedes aegypti* (Newton et al., 1976) και στο *Culex pipiens* (Sweeny and Barr, 1977) υπάρχουν στοιχεία που προκαλούν παραμόρφωση της αναλογίας φύλου (sex ratio distorters) και ήταν ικανά να παράγουν ακραίες αναλογίες φύλου με πάνω από 90% αρσενικά. Αν και δεν υπήρχε εξήγηση για τη μοριακή βάση αυτών των «παραμορφωτών», θεωρήθηκε ότι σχετίζονται με ρήξεις στο X χρωμόσωμα κατά τη διάρκεια της μείωσης I. Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν στην ιδέα ανάπτυξης τεχνητών sex ratio distorters ως μια εναλλακτική για τον γενετικό έλεγχο εντόμων.

Με την ανακάλυψη ειδικών γονιδίων που ονομάζονται homing endonuclease genes (HEGs), τα οποία κωδικοποιούν ειδικές ενδονουκλεάσες, προτάθηκε πως αυτά τα ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να στοχεύσουν ειδικά στο X χρωμόσωμα και να προκαλέσουν ρήξεις οδηγώντας στην καταστροφή του. Εάν οι ενδονουκλεάσες αυτές εκφραστούν στη διάρκεια της μείωσης θα παράγονται αποκλειστικά αρσενικοί γαμέτες, παραμορφώνοντας τελικά την αναλογία του φύλου των απογόνων υπέρ των αρσενικών (Burt, 2003). Συγκεκριμένα οι HEGs αποτελούν μια τάξη εγωιστικών γενετικών στοιχείων που βρίσκονται φυσικά σε πολλά μικρόβια, μονοκύτταρους μύκητες, βακτήρια, φυτά, πρώτιστα αλλά όχι σε ανώτερα ζώα και κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν και κόβουν το DNA που περιέχει μια ειδική αλληλουχία νουκλεοτιδίων 18-30 bp η οποία υπάρχει συνήθως μία φορά στο γονιδίωμα. Αυτή η αλληλουχία βρίσκεται μόνο σε χρωμοσώματα που δεν περιέχουν το γονίδιο HEG και ακριβώς στο σημείο που δρα η HEG ενδονουκλεάση. Έπειτα από μία δίκλωνη ρήξη σε έναν ετεροζυγότη, ο ομόλογος μηχανισμός επιδιόρθωσης του κυττάρου ενεργοποιείται και χρησιμοποιεί το χρωμόσωμα που περιέχει το γονίδιο HEG ως μήτρα, και έτσι το HEG αντιγράφεται στο χρωμόσωμα στο οποίο πριν από λίγο ήταν απόν, μετατρέποντας έναν ετεροζυγότη σε ομοζυγότη (Deredec et al., 2008; Deredec et al., 2011).

Το αρχικό σύστημα X-shredding δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας την ενδονουκλεάση HEG I-Pp01, η οποία αναγνωρίζει και τέμνει τις ριβοσωμικές επαναλήψεις rDNA στο *Anopheles gambiae*. Οι επαναλήψεις rDNA του *A. gambiae* εντοπίζονται αποκλειστικά στην κεντρομερική περιοχή του X χρωμοσώματος. Η έκφραση της I-Pp01 κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης στα διαγονιδιακά κουνούπια προκαλεί δίκλωνη ρήξη στα X χρωμοσώματα των σπερματοζωαρίων. Η παραγωγή των γαμετών με το Y χρωμόσωμα παραμένει ανεπηρέαστη και έτσι προκαλείται πλεόνασμα αρσενικών έπειτα από τη σύζευξη με τα θηλυκά αγρίου τύπου (Windbichler et al., 2008; Galizi et al., 2014. Η

διαθεσιμότητα πλέον ευέλικτων συστημάτων επεξεργασίας των γονιδιωμάτων, οδήγησε τα επόμενα χρόνια στην ανάπτυξη μιας εναλλακτικής τεχνολογίας X-shredding βασιζόμενη στη χρήση του συστήματος CRISPR (Galizi et al., 2016). Εξασφαλίζοντας την έκφραση της Cas9 κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, αλλά στοχεύοντας μια αλληλουχία του rDNA του X χρωμοσώματος διαφορετική από την αλληλουχία-στόχο της I-PproI, επιτεύχθηκε υψηλή παραμόρφωση της αναλογίας φύλου υπέρ των αρσενικών

Με λίγα λόγια το X-shredding είναι ένα σύστημα κατά το οποίο μια RNA-καθοδηγούμενη νουκλεάση επάγει δίκλωνες ρήξεις σε πολλαπλές θέσεις στο X χρωμόσωμα κατά τη διάρκεια τη σπερματογένεσης καταστρέφοντάς το. Ως αποτέλεσμα, οι γαμέτες που φέρουν το X χρωμόσωμα είναι μη βιώσιμοι, ενώ αντίθετα το λειτουργικό σπέρμα που φέρει το χρωμόσωμα Y είναι υπεύθυνο για την γονιμοποίηση των θηλυκών, παράγοντας τελικά μόνο αρσενικούς απογόνους.

1.5 Σύγκριση SIT/RIDL/X-shredding

Από τις τρεις παραπάνω μεθόδους, μαθηματικά μοντέλα έδειξαν ότι το X-shredding και το fsRIDL είναι πιο αποτελεσματικές από την SIT για την μείωση των πληθυσμών των εντόμων (Schliekelman et al., 2005). Το X-shredding υπερτερεί του συστήματος fsRIDL καθώς το X-shredding παράγει διπλάσια ποσότητα διαγονιδιακών αρσενικών απογόνων από το fsRIDL.

Δύο έννοιες που εξηγούν αυτό το φαινόμενο είναι η αναπαραγωγική ικανότητα (fecundity) και η γονιμότητα (fertility). Η αναπαραγωγική ικανότητα αναφέρεται στη φυσιολογική μέγιστη πιθανότητα ενός οργανισμού να αναπαραχθεί και μετριέται με βάση τον αριθμό των γαμετών που παράγονται. Η γονιμότητα ορίζεται ως η φυσική ικανότητα ενός οργανισμού να αναπαράγεται και μετριέται με τον αριθμό των απογόνων που παράγονται από την διαδικασία της σύζευξης. Το σύστημα X-shredding επηρεάζει την αναπαραγωγική ικανότητα γιατί δρα πριν το σχηματισμό του ζυγωτού δηλαδή στον σχηματισμό των γαμετών, εξαλείφοντας τα X σπερματοζωάρια. Οι γαμέτες που απομένουν είναι τα Y σπερματοζωάρια παράγοντας μόνο αρσενικούς απογόνους. Αντίθετα, το fsRIDL επηρεάζει τη γονιμότητα, καθώς δρα στους απογόνους οδηγώντας στη θνησιμότητα των θηλυκών. Συνεπώς, αφού στο fsRIDL τα δύο φύλα παράγονται σε ίσο ποσοστό, είναι συγκριτικά με το X-shredding 50% λιγότερο αποτελεσματικό στο να παρέχει το σύστημα με αρσενικούς τροποποιημένους απογόνους.

1.6 Προϋποθέσεις για την ανάπτυξη του συστήματος X-shredding

Για να είναι εφικτή η ανάπτυξη και εφαρμογή του συστήματος X-shredding σε κάποιο έντομο ενδιαφέροντος χρειάζεται να πληρούνται οι εξής προϋποθέσεις (Parathanos and Windbichler, 2018; Tsoumani et al., 2019):

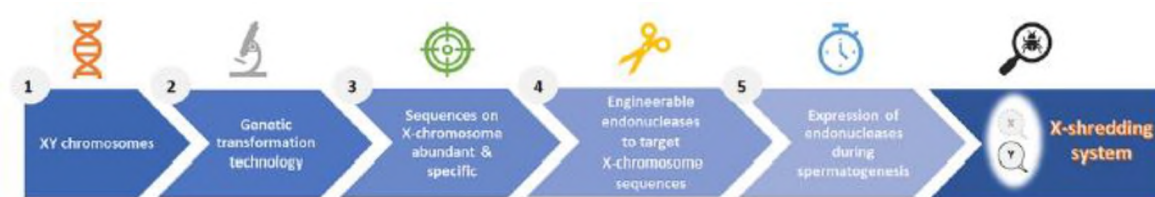
1) Ο φυλοκαθορισμός του εντόμου πρέπει να προκύπτει από τα XY χρωμοσώματα.

2) Είναι αναγκαία η ύπαρξη τεχνολογίας για γενετικό μετασχηματισμό. Εκτός από τον κατάλληλο εργαστηριακό εξοπλισμό, είναι απαραίτητα διάφορα μοριακά εργαλεία όπως φορείς κλωνοποίησης και γονίδια αναφοράς.

3) Πρέπει να υπάρχουν ενδογενείς επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, οι οποίες εντοπίζονται αποκλειστικά στο X χρωμόσωμα.

4) Χρειάζεται μια ενδονουκλεάση ειδική για την αναγνώριση και τη ρήξη των αλληλουχιών του X χρωμοσώματος.

5) Είναι απαραίτητοι ειδικοί υποκινητές (ρυθμιστικά στοιχεία) που θα εκφράζονται κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης και θα ελέγχουν τη δραστικότητα της ενδονουκλεάσης.



Εικόνα 1.1 Σχηματική απεικόνιση των προϋποθέσεων για την εφαρμογή του συστήματος X-shredding (Tsoumani et al., 2019)

1.6.1 XY φυλοκαθορισμός

Υπάρχουν πολλά είδη συστημάτων καθορισμού φύλου, το οποίο μπορεί να καθορίζεται γενετικά ή σε απάντηση με τα περιβαλλοντικά σήματα όπως η θερμοκρασία ή οι κοινωνικές συνθήκες. Ο γενετικός καθορισμός φύλου συνήθως εκφράζεται κατά τη διάρκεια του ζυγωτού και καθοριστικό ρόλο παίζουν τα φυλετικά χρωμοσώματα. Στα περισσότερα είδη τα XY φυλετικά χρωμοσώματα καθορίζουν το αρσενικό άτομο και τα XX το θηλυκό. Ωστόσο αυτό δεν αποτελεί κανόνα και σε αρκετά είδη το ετερογαμετικό φύλο είναι αυτό του θηλυκού συχνά αναπαριστώντας αυτό το σύστημα φυλοκαθορισμού με τα σύμβολα ZW. Στα συστήματα φυλοκαθορισμού με XY χρωμοσώματα το θηλυκό δίνει πάντα το X χρωμόσωμα με τον γαμέτη του που είναι το ωάριο και το αρσενικό δίνει ένα X χρωμόσωμα ή ένα Y χρωμόσωμα με το σπερματοζωάριο.

Για την εφαρμογή του συστήματος X-shredding απαραίτητη προϋπόθεση είναι το φύλο να καθορίζεται γενετικά με XY φυλοκαθορισμό. Στο X-shredding η παρεμβολή γίνεται στο αναπαραγωγικό σύστημα και χρειάζεται να υπάρχει ένας τρόπος διαχωρισμού του θηλυκού από το αρσενικό το οποίο πετυχαίνεται από τα χρωμοσώματα XY. Το τελικό αποτέλεσμα του X-shredding είναι να τεμαχίσει το X χρωμόσωμα στα σπερματοζωάρια ώστε μόνο τα σπερματοζωάρια με το Y χρωμόσωμα να είναι ικανά για γονιμοποίηση των θηλυκών, δίνοντας πάντα XY απόγονο. Στην παρούσα εργασία το έντομο ενδιαφέροντος είναι ο δάκος της ελιάς του οποίου ο φυλοκαθορισμός γίνεται με τα χρωμοσώματα XY και συνεπώς είναι εφικτή η ανάπτυξη του συστήματος X-shredding σε αυτό τον οργανισμό.

1.6.2 Τεχνολογία γενετικού μετασχηματισμού

Η πρώτη επιτυχημένη προσπάθεια γενετικού μετασχηματισμού στα έντομα έγινε το 1982 στη *Drosophila Melanogaster* (Rubin and Spradling, 1982), με ένα σύστημα που αναπτύχθηκε με βάση το μεταθετό στοιχείο P. Ωστόσο αυτό το σύστημα δεν μπορούσε να λειτουργήσει σε οργανισμούς που δεν άνηκαν στην οικογένεια των Δροσοφιλίδων και έτσι μετά από 13 χρόνια καταφέρθηκε και έγινε ο μετασχηματισμός στην *Ceratitis capitata* (Loukeris et al., 1995). Πλέον υπάρχουν τέσσερα διαφορετικά συστήματα γενετικού μετασχηματισμού, πέρα από αυτά που έχουν δημιουργηθεί για τη *D. melanogaster*, και όλα βασίζονται στις κινητικές ιδιότητες των μεταθετών στοιχείων της τάξης II. Αυτά μεταθέτονται μέσω του μηχανισμού αποκοπής και επικόλλησης (cut-and-paste) και είναι τα εξής: το Hermes (O' Brochta et al., 1995), το mariner (Lampe et al., 2000), το Minos (Loukeris et al., 1995) και το piggyBac (Fraser, 2000). Τα συστήματα αυτά είναι χρήσιμα για τη δημιουργία φορέων γιατί είναι απλά συστήματα ανασυνδυασμού και χρειάζονται μόνο ένα στοιχείο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη της τρानσποζάσης. Η τρानσποζάση συνήθως παρέχεται από την παροδική έκφραση του γονιδίου της τρानσποζάσης από έναν βοηθητικό μη ενσωματωμένο φορέα, ο οποίος εισάγεται με ένεση στα προβλαστοδερμικά έμβρυα μαζί με τον κύριο φορέα.

Η τεχνολογία του γενετικού μετασχηματισμού βασίζεται σε βιώσιμες φυσικές και βιολογικές μεθόδους για τη μεταφορά των διαγονιδίων στα κύτταρα και τελικά στον πυρήνα. Για σταθερό μετασχηματισμό εντόμων ο στόχος της εισαγωγής του DNA είναι τα βλαστικά κύτταρα. Ο μετασχηματισμός της γαμετικής σειράς απαιτεί τη μεταφορά του DNA που περιέχει το διαγονίδιο σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, κατά τα οποία τα πρόδρομα κύτταρα της γαμετικής σειράς, που ονομάζονται πολικά κύτταρα, μεταναστεύουν στον οπίσθιο πόλο του εμβρύου. Οι μέθοδοι εισαγωγής του DNA στους πυρήνες των πολικών κυττάρων έχουν σημαντικό αντίκτυπο στην αποτελεσματικότητα και στην εφαρμογή των διαγονιδιακών τεχνολογιών και η επιλογή τους βασίζεται στα φυσιολογικά και αναπτυξιακά χαρακτηριστικά του εντόμου στόχου. Η διαδικασία της μικροένεσης των γενετικών κατασκευών αποτελεί την πιο δημοφιλή μέθοδο στις περιπτώσεις γενετικού μετασχηματισμού των περισσότερων δίπτερων. Οι μικροενέσεις πραγματοποιούνται με μικροχειριστές χρησιμοποιώντας λεπτές γυάλινες βελόνες στον οπίσθιο πόλο του γονιμοποιημένου ωαρίου. Το κυριότερο πρόβλημα κατά τη διαδικασία της μικροένεσης είναι η έγκαιρη εισαγωγή του νέο-εισαχθέντος DNA πριν το σχηματισμό των κυτταρικών μεμβρανών, ενώ κρίσιμα είναι και τα ιδιαίτερα μορφολογικά χαρακτηριστικά των εμβρύων (αυγών) μεταξύ διαφορετικών ειδών εντόμων που μπορεί να οδηγήσουν στο θάνατο των ενεμένων αυγών.

1.6.3 Redkmer

Η τρίτη προϋπόθεση για την ανάπτυξη του συστήματος X-shredding είναι η ύπαρξη μιας επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας που εντοπίζεται αποκλειστικά στο X χρωμόσωμα. Το X-shredding εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στο *Anopheles gambiae*, στο οποίο το φυλετικό X χρωμόσωμα εντοπίζονται αποκλειστικά εκατοντάδες αντίγραφα του 28S rDNA, και αποτελεί ιδανική αλληλουχία DNA-στόχου για τεμαχισμό από μια νουκλεάση. Ωστόσο επειδή αυτή η διάταξη του rDNA δεν υπάρχει στην πλειοψηφία των εντόμων, είναι δύσκολη η εύρεση κατάλληλης αλληλουχίας-στόχου σε άλλους οργανισμούς. Ακόμη οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που είναι ιδανικές για στόχευση μέσω του συστήματος X-shredding είναι εκ των πραγμάτων απύσες από τις συναρμολογήσεις γονιδιωμάτων υψηλής ποιότητας. Οι περιορισμοί αυτοί οδήγησαν στην ανάγκη για την ανάπτυξη μιας μεθοδολογίας που θα επιτρέπει την αναγνώριση τέτοιων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών.

Προς την κατεύθυνση αυτή αναπτύχθηκε η βιοπληροφορική μέθοδος Redkmer (Repeated Element Database k-mer) που εξασφαλίζει τον εντοπισμό επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του X χρωμοσώματος χωρίς να είναι απαραίτητη η ύπαρξη συναρμολόγησης του γονιδιώματος του οργανισμού ενδιαφέροντος (Parathanos and Windbichler, 2018). Μπορεί και εντοπίζει μικρές αλληλουχίες μήκους 25 nt (kmers) ειδικές για το X χρωμόσωμα σε είδη με XY αρσενικό καρυότυπο που θα αποτελέσουν τις αλληλουχίες-στόχους για τις RNA-καθοδηγούμενες ενδονουκλεάσες του συστήματος CRISPR/Cas.

Οι τρεις βασικές αρχές της μεθόδου για τον εντοπισμό και την επιλογή στόχου είναι οι ακόλουθες:

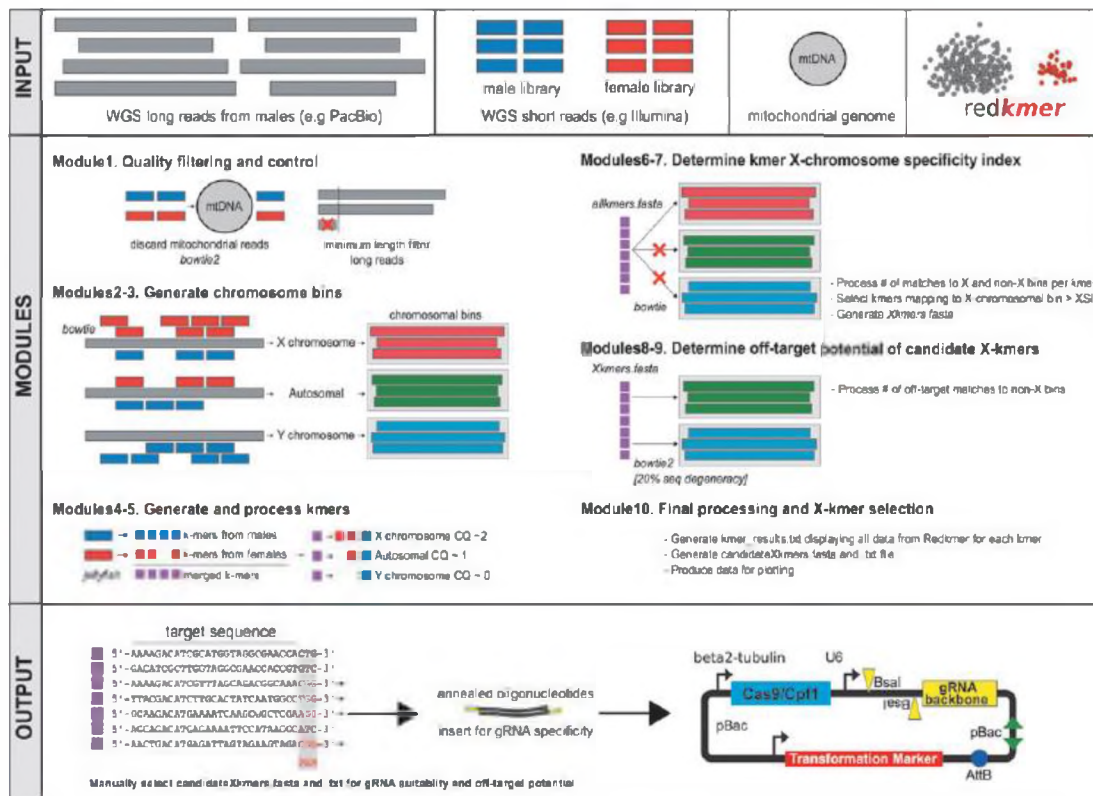
- 1) Αρχικά τα kmers του X χρωμοσώματος εντοπίζονται με βάση την εκτίμηση της διαφορικής αντιπροσώπευσης στα δεδομένα WGS (Whole Genome Sequencing) θηλυκών προς τις αρσενικές αναγνώσεις, δηλαδή με το χρωμοσωμικό συντελεστή CQ (chromosome quotient).
- 2) Τα kmers που εντοπίζονται σε άλλα χρωμοσώματα ακολούθως αποκλείονται.
- 3) Τα kmers τα οποία είναι τα πιο άφθονα και συγχρόνως παρουσιάζουν ειδικότητα για το X χρωμόσωμα επιλέγονται.

Τα δεδομένα που χρειάζονται για το Redkmer ως πληροφορίες εισόδου είναι δεδομένα WGS (Whole Genome Sequencing) σε μακρές ενός μορίου αναγνώσεις (long reads, Pacbio) αρσενικών ατόμων, μικρές αναγνώσεις μήκους 100 nt (short reads, Illumina) από βιβλιοθήκες θηλυκών και αρσενικών ατόμων και ένα αρχείο σε μορφή fasta με το μιτοχονδριακό γονιδίωμα αναφοράς.

Συνοπτικά, η μέθοδος έχει ως εξής: Αρχικά απορρίπτονται οι αναγνώσεις που προέρχονται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Έπειτα οι μικρές αναγνώσεις της Illumina στοιχίζονται στις μεγάλες αναγνώσεις της Pacbio και με βάση τη συχνότητα υπολογίζεται η αναλογία CQ. Με αυτόν τον δείκτη προβλέπεται η χρωμοσωμική προέλευση, με τις αλληλουχίες που προέρχονται από το X χρωμόσωμα να χαρακτηρίζονται από $CQ \sim 2$, τις αλληλουχίες που

προέρχονται από αυτοσωμικά χρωμοσώματα να χαρακτηρίζονται από $CQ \sim 1$ και τις Y-ειδικές αλληλουχίες να χαρακτηρίζονται από $CQ \sim 0$. Με βάση τις τιμές αναλογιών CQ δημιουργούνται ακολούθως οι τρεις διακριτοί χρωμοσωμικοί κάδοι ('chromosome-derived bins') και οι αναγνώσεις ομαδοποιούνται στον κατάλληλο κάδο (X, αυτοσωμικός, Y) με βάση τα CQ τους. Σε επόμενο βήμα οι αναγνώσεις της Illumina τμηματοποιούνται σε μικρότερες αλληλουχίες που αποτελούν τα kmers. Τα kmers από τη θηλυκή και την αρσενική βιβλιοθήκη ανακατεύονται και υπολογίζεται το CQ του κάθε kmer. Ακολούθως, τα kmers που προέρχονται από τον αυτοσωμικό και τον Y κάδο αποκλείονται. Τα kmers που προέρχονται από τον X κάδο ελέγχονται ως προς την ύπαρξη πιθανών μη ειδικών-στόχων (off-targets) σε άλλα χρωμοσώματα με βάση τον αυτοσωμικό και τον Y κάδο.

Ως τελική πληροφορία εξόδου η μέθοδος παράγει μια λίστα με τα kmer που εντοπίζονται αποκλειστικά στο χρωμόσωμα X καθώς και τη συχνότητα εμφάνισής τους. Εκτός από τις αλληλουχίες των 25 nt των kmer περιλαμβάνονται και οι παρακείμενες αλληλουχίες ώστε να είναι εφικτή η επιλογή του κατάλληλου kmer με βάση το επιθυμητό μοτίβο PAM ανάλογα με την ενδονουκλεάση που θα χρησιμοποιηθεί στο σύστημα CRISPR (Parathanos and Windbichler, 2018).

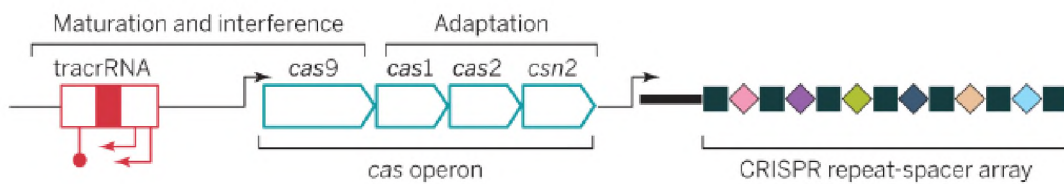


Εικόνα 1.2 Σχηματική απεικόνιση όλων των βημάτων για το Redkmer (Parathanos and Windbichler, 2018)

1.6.4 Το σύστημα CRISPR/ Cas

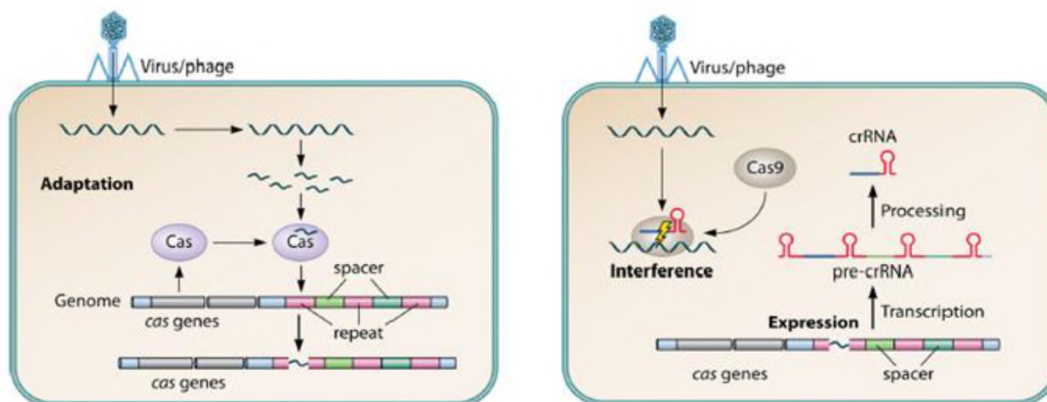
Το σύστημα CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR associated proteins) είναι ένα φυσικό προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα στα περισσότερα βακτήρια και αρχαία. Το CRISPR/Cas σύστημα αποτελείται από γονίδια Cas που οργανώνονται σε οπερόνια και μια συστοιχία CRISPR που περιέχει μοναδικές αλληλουχίες που στοχεύουν γονιδιώματα οι οποίες ονομάζονται spacers που παρεμβάλλονται από πανομοιότυπες επαναλήψεις (repeats). Το σύστημα CRISPR-Cas βοηθάει τον ξενιστή του να καταπολεμήσει βακτηριοφάγους και άλλα ξένα κινητά γενετικά στοιχεία, όπως πλασμίδια (Ishino et al., 1987; Mojica et al., 2005; Barrangou et al., 2007).

Genomic CRISPR locus



Εικόνα 1.3 Η οργάνωση του γενετικού τύπου CRISPR (Doudna and Charpentier, 2014)

Η αμυντική ικανότητα του CRISPR περιλαμβάνει τρία στάδια. Το πρώτο είναι η προσαρμογή (adaptation) κατά το οποίο μικρά τμήματα DNA ομόλογα σε ιικές ή πλασμιδιακές αλληλουχίες ενσωματώνονται στον γενετικό τόπο CRISPR. Κάθε ενσωμάτωση συνοδεύεται και από τον διπλασιασμό μιας επανάληψης και έτσι δημιουργείται μια καινούρια μονάδα spacer-επανάληψης. Η επιλογή του πρόδρομου spacer (proto-spacer) από το νέο-εισαχθέν DNA καθορίζεται από την αναγνώριση του μοτίβου δίπλα από το proto-spacer ή αλλιώς την αλληλουχία PAM (Proto-spacer Adjacent Motif). Οι αλληλουχίες PAM έχουν μήκος μερικά νουκλεοτίδια και διαφέρουν μεταξύ των διάφορων τύπων του συστήματος CRISPR. Το δεύτερο στάδιο είναι η έκφραση (expression) κατά το οποίο ένα μακρύ πρόδρομο μετάγραφο από τον τόπο του CRISPR (pre-crRNA) παράγεται και επεξεργάζεται σε μικρά



Εικόνα 1.4 Τα τρία στάδια του CRISPR. Προσαρμογή τμημάτων του ιού στο γενετικό τόπο του CRISPR (αριστερά). Έκφραση και παρεμβολή έπειτα από επαναμόλυνση στον ίδιο ιό (δεξιά), (Ishino et al., 2018)

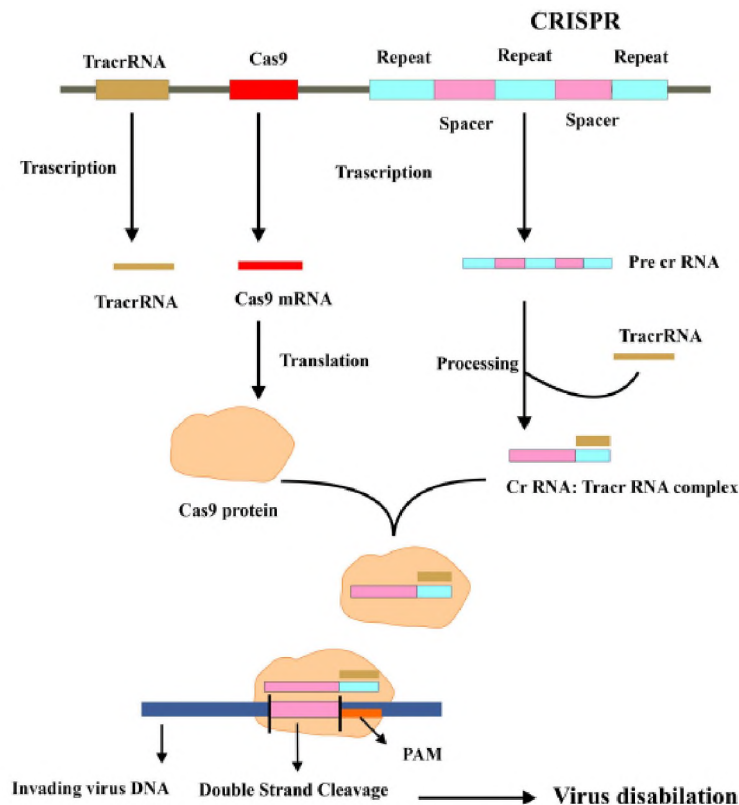
crRNAs. Αυτό το βήμα καταλύεται από ενδοριβονουκλεάσες που είτε λειτουργούν ως υπομονάδα ενός μεγαλύτερου συμπλόκου είτε ως μεμονωμένα ένζυμα. Το τρίτο στάδιο είναι η παρεμβολή (interference) κατά το οποίο το ξένο DNA στοχεύεται και τέμνεται εντός της αλληλουχίας proto-spacer. Τα crRNA οδηγούν τα αντίστοιχα σύμπλοκα των πρωτεϊνών Cas στη συμπληρωματική αλληλουχία στόχο των ιών ή των πλασμιδίων που ταιριάζουν στα spacer. Οι αλληλουχίες PAM παίζουν σημαντικό ρόλο στο στάδιο της παρεμβολής (Makarova et al., 2011).

Όταν ένας ιός επιτεθεί σε ένα βακτήριο, τμήματα από το ιϊκό γονιδίωμα εισέρχονται στην αλληλουχία του τόπου CRISPR του βακτηρίου και δρα ως μνήμη, δηλαδή σε μια επαναμόλυνση από τον ίδιο ιό, το βακτήριο αναγνωρίζει τον ιό χρησιμοποιώντας αυτή τη μνήμη και με ειδικές ενδοουκλεάσες Cas, το βακτήριο προκαλεί δίκλωνη ρήξη στο γονιδίωμα του ιού και τον απενεργοποιεί (Mohammadzadeh et al., 2020).

Η τάξη 1 του συστήματος CRISPR λειτουργεί με συμπλέγματα τελεστών πολλών υπομονάδων που αποτελούνται από 4 ως 7 Cas πρωτεΐνες, ενώ η τάξη 2 χρησιμοποιεί μία τελεστή πρωτεΐνη η οποία περιέχει πολλές επικράτειες (Ishino et al., 2018). Βρέθηκε ότι αποκλειστικά η δράση της πρωτεΐνης Cas9 είναι ικανή να προκαλέσει παρέμβαση σε πλασμίδιο στο *E. coli* (Saprunauskas et al., 2011), συνεπώς πυροδοτήθηκε μεγάλο ενδιαφέρον και προέκυψαν αρκετές μελέτες για αυτήν και το σύστημα CRISPR/Cas9 έγινε ένα από τα πιο σημαντικά εργαλεία της μοριακής βιολογίας.

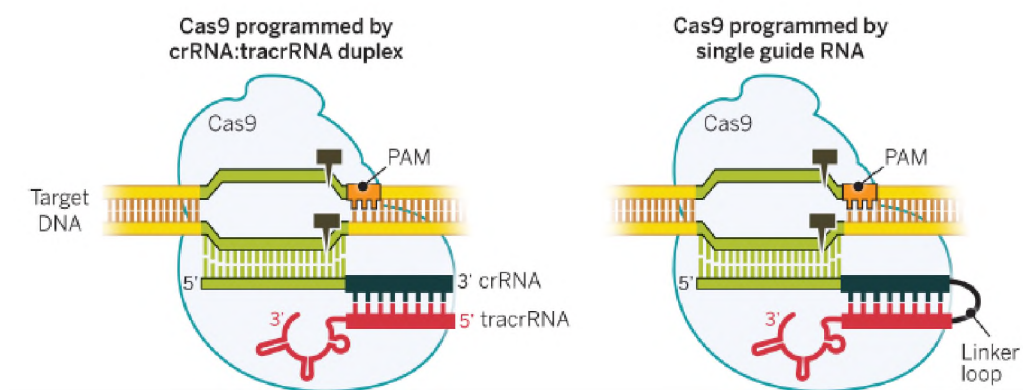
1.6.4.1 Ενδοουκλεάση Cas9

Η Cas9 είναι μια ενδοουκλεάση που ανήκει στην τάξη 2 και στον τύπο II του συστήματος CRISPR. Η Cas9 περιέχει επικράτειες ομόλογες προς τις ενδοουκλεάσες HNH και RuvC (Jinek et al., 2012). Κάθε μία επικράτεια τέμνει από μία έλικα του DNA. Η Cas9 χρειάζεται δύο αλληλουχίες RNA-οδηγούς και χρησιμοποιεί το σύμπλοκο tracrRNA-crRNA για να κατευθύνει τη ρήξη του DNA. Το tracrRNA (trans-activating crRNA) είναι ένα μικρό RNA το οποίο κωδικοποιείται ανοδικά της περιοχής CRISPR, είναι σημαντικό για την ωρίμανση του crRNA από την ριβονουκλεάση III και την Cas9 και μετέπειτα στο στάδιο της παρεμβολής για να οδηγήσει την Cas9 στο στόχο της. Το σύμπλοκο του tracrRNA-crRNA σχηματίζεται γιατί το tracrRNA περιέχει αλληλουχία συμπληρωματική με ένα μέρος του crRNA, το οποίο προέρχεται από την αλληλουχία επανάληψης (repeat). Το υπόλοιπο μέρος του crRNA προέρχεται από την αλληλουχία spacer και είναι συμπληρωματικό στην αλληλουχία-στόχο του ξένου DNA. Συγκεκριμένα, η στόχευση του DNA απαιτεί ζευγάρωμα βάσεων μεταξύ του crRNA και της αλληλουχίας-στόχου, καθώς και την παρουσία της μικρής αλληλουχίας PAM δίπλα από την αλληλουχία-στόχο στο DNA



Εικόνα 1.5 Ο γενετικός τύπος του CRISPR/Cas9 και όλα τα στάδια έκφρασης και επεξεργασίας μέχρι και το στάδιο της παρεμβολής (Mohammadzadeh et al., 2020)

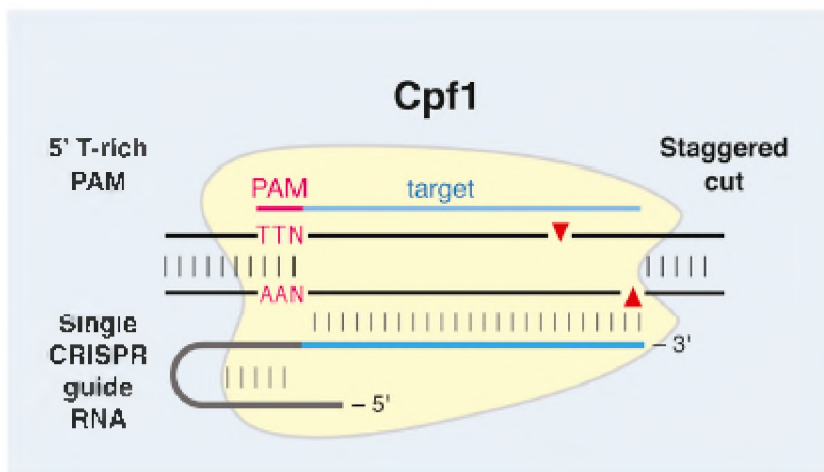
Η HNH επικράτεια προκαλεί ρήξη στον κλώνο του DNA που είναι συμπληρωματικός του crRNA, ενώ η επικράτεια RuvC κόβει τον μη συμπληρωματικό κλώνο. Η Cas9 από το *Streptococcus pyogenes* αναγνωρίζει την αλληλουχία PAM 5'-NGG-3', η οποία βρίσκεται μία βάση καθοδικά (downstream) της αλληλουχίας πρόσδεσης του crRNA (Doudna and Charpentier, 2014). Το σύμπλοκο tracrRNA-crRNA είναι εφικτό να σχεδιαστεί ως ένας μονός οδηγός RNA (single guide RNA, sgRNA). Αυτή η χμαιρική κατασκευή περιέχει στο 5' άκρο την αλληλουχία αναγνώρισης-στόχο και ακολουθεί μία δομή φουρκέτας (hairpin) διατηρώντας τις αλληλεπιδράσεις του ζευγαρώματος βάσεων που συμβαίνουν μεταξύ του tracrRNA και του crRNA ώστε να δεσμεύεται αποτελεσματικά η Cas9 (Jinek et al., 2012).



Εικόνα 1.6 Το σύμπλοκο crRNA-tracrRNA κατά τη διάρκεια της παρεμβολής (αριστερά). Η χμαιρική κατασκευή του sgRNA κατά τη διάρκεια της παρεμβολής (Doudna and Charpentier, 2014)

1.6.4.2 Ενδονουκλεάση Cpf1

Μια ενδονουκλεάση του συστήματος CRISPR που ανακαλύφθηκε πιο πρόσφατα προσφέρει νέες ιδιότητες και ενδιαφέρον. Πρόκειται για τη Cpf1 (Cas12a) η οποία ανήκει στην τάξη 2 και στον τύπο V, είναι μια μεγάλη πρωτεΐνη 1300 περίπου αμινοξέων και πήρε το όνομά της από τα βακτήρια από τα οποία απομονώθηκε δηλαδή CRISPR από το *Prevotella* και το *Francisella 1* (Zetsche et al., 2015). Η Cpf1 περιέχει μια επικράτεια ενδονουκλεάση RuvC η οποία είναι υπεύθυνη και για τις δύο ρήξεις που προκαλεί στο DNA. Η συστοιχία CRISPR επεξεργάζεται σε μικρά ώριμα crRNA χωρίς τη βοήθεια άλλου RNA (tracrRNA), ούτε της RNAάσης III, αφού η κατάλυση του πρόδρομου crRNA γίνεται από την ίδια τη Cpf1 η οποία έχει ενδογενή δραστικότητα ριβονουκλεάσης. Το ώριμο crRNA της Cpf1 αποτελείται από 42-44 νουκλεοτίδια, από τα οποία 19 νουκλεοτίδια προέρχονται από την επανάληψη και δημιουργούν μια μικρή θηλιά και 23-25 νουκλεοτίδια προέρχονται από την αλληλουχία spacer. Η αλληλουχία PAM που αναγνωρίζουν τα ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια της Cpf1 είναι πλούσια σε θυμιδίνες αλλά μπορεί να διαφέρει ο συνολικός αριθμός των θυμιδινών. Η Cpf1 αναγνωρίζει το μοτίβο PAM 5'-TTTV-3' που βρίσκεται ανοδικά του spacer στην αλυσίδα στόχο και τέμνει το DNA στόχο σε μακρινή απόσταση από το τέλος της PAM παράγοντας κολλώδη άκρα (Safari et al., 2019; Zetsche et al., 2015).



Εικόνα 1.7 Το ζευγάρι των βάσεων του sgRNA, η αναγνώριση του μοτίβου PAM της Cpf1 κατά τη διάρκεια της παρεμβολής (Zetsche et al., 2015)

1.6.4.3 Διαφορές Cas9 & Cpf1

Οι ενδονουκλεάσες Cas9 και Cpf1 ανήκουν και οι δύο στην τάξη 2 του συστήματος CRISPR, μοιράζονται κάποια κοινά χαρακτηριστικά αλλά έχουν διακριτές ιδιότητες. Η πρώτη τους διαφορά είναι ότι κατά τη βιοσύνθεση του crRNA, το pre-crRNA στην Cas9 απαιτεί ένα μόριο tracrRNA και επεξεργάζεται από την RNase III, ενώ η επεξεργασία του pre-crRNA στη Cpf1 καταλύεται από την ίδια τη Cpf1 και δεν απαιτεί κάποιο άλλο μόριο RNA. Σε περίπτωση πολλαπλής στόχευσης σε διαφορετικά σημεία ταυτόχρονα με τη μέθοδο multiplex, τα gRNAs μπορούν να εκφραστούν σε έναν φορέα ως ένα μετάγραφο το οποίο η Cpf1 θα επεξεργαστεί ακολούθως το κάθε crRNA. Η εφαρμογή της μεθόδου Multiplex με

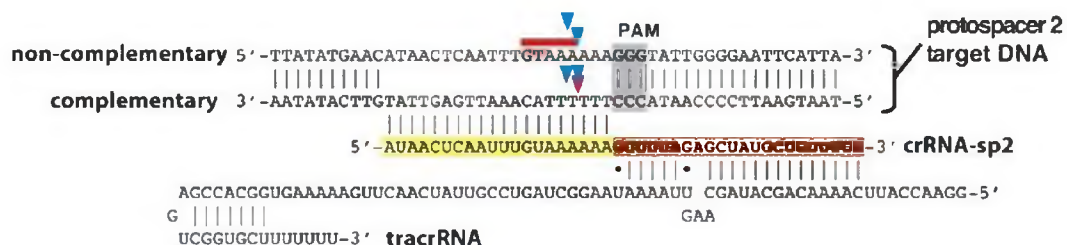
την Cas9 θα απαιτούσε κάθε gRNA να εκφραστεί από διαφορετικό φορέα ή κάθε gRNA να έχει το δικό του υποκινητή αν εκφράζονταν από την ίδια κατασκευή (Swartz and Jinek, 2017).

Ένα επόμενο σημείο διαφοροποίησης εντοπίζεται στο crRNA κάθε ενδονουκλεάσης. Το ώριμο crRNA της Cpf1 είναι μικρότερο σε μήκος από της Cas9. Σε εφαρμογές για την επεξεργασία του γονιδιώματος, το gRNA για τη Cpf1 είναι περίπου 43 nt ενώ για την Cas9 είναι περίπου 100 nt αφού η Cas9 απαιτεί και ένα tracrRNA μόριο, το οποίο συγχωνεύεται στη δημιουργία του gRNA με το crRNA. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως είναι πιο εύκολη και φθηνότερη η in vitro σύνθεση gRNA για τη Cpf1 (Nakade et al., 2017).

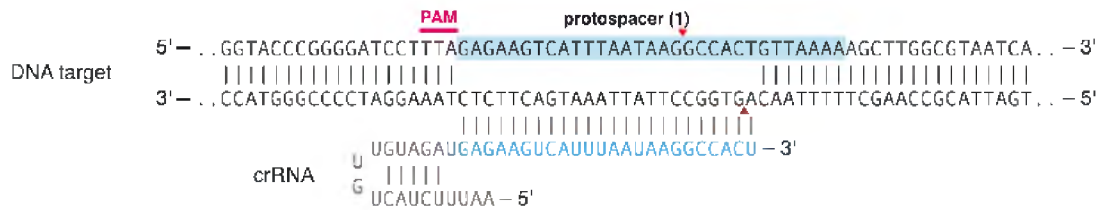
Μια τρίτη διαφορά εντοπίζεται στα χαρακτηριστικά των αλληλουχιών PAM και στα σημεία δημιουργίας ρήξεων. Η Cas9 αναγνωρίζει αλληλουχίες PAM πλούσιες σε γουανίνη και βρίσκεται στο 3' άκρο του crRNA, ενώ η Cpf1 αναγνωρίζει αλληλουχίες PAM πλούσιες σε θυμίνη και βρίσκεται στο 5' άκρο του crRNA. Η Cpf1 τέμνει το DNA μακριά από την αλληλουχία PAM ενώ η Cas9 προκαλεί ρήξη αμέσως μετά τη PAM. Αυτό σημαίνει πως η Cpf1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πολλούς επακόλουθους γύρους ρήξεων έχοντας ως αλληλουχία στόχο την ίδια περιοχή και PAM αφού οι προσθήκες ή οι ελλείψεις κατά την επιδιόρθωση του κυττάρου που είναι πιθανό να προκύψουν, βρίσκονται μακριά από την PAM. Αντίθετα στην περίπτωση της Cas9 οποιαδήποτε προσθήκη ή έλλειψη θα προέκυπτε μετά την επιδιόρθωση θα διατάραζε την περιοχή-στόχο της Cas9 μην επιτρέποντας τη δυνατότητα εισαγωγής νέου DNA στη δεδομένη εκείνη περιοχή.

Κατά τη ρήξη του DNA η Cpf1 παράγει προεξέχοντα 5' άκρα, ενώ η Cas9 παράγει λεία άκρα. Τα προεξέχοντα άκρα είναι ευνοϊκά για εισαγωγή νεοεισαχθέντος DNA και επιδιόρθωση με μη ομόλογη σύνδεση άκρων (non homologous end joining, NHEJ), εξασφαλίζοντας παράλληλα την κατευθυνόμενη ενσωμάτωση του επιθυμητού γονιδίου να έχει τη σωστή κατεύθυνση αφού η αλληλουχία του προεξέχοντος άκρου είναι γνωστή (Zetsche et al., 2015).

Τέλος φαίνεται πως η λειτουργία της Cpf1 επηρεάζεται από τη θερμοκρασία in vivo και in vitro, με τη δραστηριότητά της να αυξάνεται σε υψηλή θερμοκρασία. Αυτή η ιδιότητά της μπορεί να καταστήσει τη θερμοκρασία ως έναν διακόπτη για τον έλεγχο της Cpf1 και να ρυθμίζεται η ικανότητά της για επιδιόρθωση με βάση τον επιθυμητό χρόνο (Moreno-Mateos et al., 2017).



Εικόνα 1.8 Σχηματική αναπαράσταση του protospacer DNA στόχου και του συμπλόκου crRNA-tracrRNA της Cas9. Φαίνονται οι συμπληρωματικές αλληλουχίες του crRNA με το protospacer DNA (κίτρινο), με το tracrRNA (πορτοκαλί), η αλληλουχία PAM (γκρι) και τα σημεία κοπής (μπλε βελόκια) (Jinek et al., 2012)



Εικόνα 1.9 Σχηματική αναπαράσταση του συμπλόκου στόχευσης της Cpf1 ανάμεσα στο DNA στόχο και το crRNA. Φαίνεται το μοτίβο PAM (ροζ) και τα σημεία κοπής (κόκκινα βελόνια) (Zetsche et al., 2015)

1.6.5 Υποκινητές λειτουργικοί κατά τη σπερματογένεση

Είναι σημαντικό η νουκλεάση που θα χρησιμοποιηθεί να εκφράζεται σε συγκεκριμένη χρονική περίοδο και ιστό. Η έκφραση πρέπει να επάγεται κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης στις γονάδες του αρσενικού εντόμου.

Η σπερματογένεση ξεκινά με τη μιτωτική διαίρεση των γαμετικών κυττάρων που βρίσκονται κοντά στη βασική μεμβράνη των σπερματοφόρων σωλήνων. Τα κύτταρα σε αυτή τη φάση ονομάζονται σπερματογονικά γαμετικά κύτταρα. Με τη μιτωτική διαίρεσή τους παράγονται κύτταρα τύπου A τα οποία αναπληρώνουν τα βλαστοκύτταρα και κύτταρα τύπου B που διαφοροποιούνται σε πρωτογενή σπερματοκύτταρα. Έπειτα το πρωτογενές σπερματοκύτταρο διαιρείται μειωτικά (Μείωση I) σε δύο δευτερεύοντα σπερματοκύτταρα (σπερματοκύττες). Κάθε δευτερογενές σπερματοκύτταρο διαιρείται (Μείωση II) σε δύο ίσες απλοειδείς σπερματίδες (σπερματίδια). Οι σπερματίδες έπειτα μετατρέπονται σε σπερματοζωάρια κατά τη διάρκεια της σπερμιόγνεσης. Από ένα πρωτογενές σπερματοκύτταρο παράγονται τέσσερα σπερματοζωάρια, δύο με το X χρωμόσωμα και δύο με το Y.

Στο σύστημα X-shredding στόχος είναι η εξάλειψη των σπερματοζωαρίων που φέρουν το X χρωμόσωμα. Αυτό επιτυγχάνεται θέτοντας την νουκλεάση υπό τον έλεγχο του ενδογενούς υποκινητή της β2 τουμπουλίνης (β2 tubulin). Αυτός ο υποκινητής ενεργοποιείται μόνο στα αρσενικά αμέσως μετά την πρώτη μειωτική διαίρεση και εξακολουθεί να είναι ενεργός καθ' όλη τη διάρκεια των ακόλουθων σταδίων της διαφοροποίησης των σπερματοζωαρίων και της παραγωγής σπέρματος (Catteruccia et al., 2005). Στο τέλος τα σπερματοζωάρια που έχουν το X χρωμόσωμα δεν θα είναι βιώσιμα καθώς το X χρωμόσωμα θα έχει κατακερματιστεί και έτσι μόνο τα σπερματοζωάρια με το Y χρωμόσωμα θα είναι ικανά να γονιμοποιήσουν τα θηλυκά δίνοντας μόνο αρσενικούς απογόνους.

1.7. Ο δάκος της ελιάς

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae* ανήκει στην οικογένεια των Tephritidae, στην τάξη των Δίπτερων (Diptera) και αποτελεί το κυριότερο παρασιτικό έντομο της ελιάς. Η κατανομή του δάκου περιορίζεται σε περιοχές με καλλιεργήσιμα και άγρια ελαιόδεντρα και εντοπίζεται

κυρίως στη Μεσογειακή λεκάνη, στη νότια και κεντρική Αφρική, στις Κανάριες Νήσους, στη Μέση Ανατολή, στην Καλιφόρνια και στην κεντρική Αμερική (Daane and Johnson, 2010).

Ο δάκος της ελιάς είναι μονοφάγο έντομο καθώς οι προνύμφες του τρέφονται αποκλειστικά από τον καρπό ορισμένων ειδών ελιάς του γένους *Olea* συμπεριλαμβανομένων των *O. europaea*, *O. verrucosa* και *O. chrysophilla* (Tzanakakis, 2003).

Ο κύκλος ζωής του δάκου αποτελείται από τέσσερα βασικά αναπτυξιακά στάδια τα οποία είναι: το αυγό (egg), η προνύμφη (larva), η νύμφη (pupa) και το ενήλικο έντομο (adult). Το θηλυκό ωοαποθέτει στον καρπό της ελιάς, ο οποίος αποτελεί τη μοναδική πηγή τροφής για την προνύμφη. Η προνύμφη τρέφεται από το μεσοκάρπιο της ελιάς και στη συνέχεια περνάει από τρία στάδια (instars) πριν το σχηματισμό της νύμφης. Μετά την έκδυση του ενήλικου εντόμου υπάρχει μια περίοδος ωρίμανσης μερικών ημερών ώστε να γίνει σεξουαλικά ενεργό (Fletcher, 1987).



Εικόνα 1.10 Ενήλικο έντομο *Bactrocera oleae*, αρσενικό (αριστερά) και θηλυκό (δεξιά) (© Tsoumani K.T.)

Τα ενήλικα έντομα χρειάζονται για την επιβίωσή τους να τρέφονται συχνά με διάφορες οργανικές ουσίες, στερεές ή υγρές, όπως εντομικά μελιτώματα, νέκταρ λουλουδιών και άλλες φυτικές εκκρίσεις, γύρη, χυμούς και ιστούς από κατεστραμμένα ή σε αποσύνθεση φρούτα (Tzanakakis, 2003). Οι προνύμφες εξασφαλίζουν από τον καρπό της ελιάς τα κυριότερα χημικά και θρεπτικά συστατικά όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και αμινοξέα, ενώ βακτήρια τους παρέχουν κάποια απαραίτητα αμινοξέα και παράγοντες ανάπτυξης (Fletcher, 1987).

Ο αριθμός των γενιών ανά χρόνο εξαρτάται από την περιοχή και κυμαίνεται από 2 μέχρι 5. Τα ζεστά και ξηρά καλοκαίρια μειώνουν την ανάπτυξη του εντόμου, ενώ η αναπαραγωγή και η προνυμφική ανάπτυξη συνεχίζεται χωρίς διακοπή όλο το χειμώνα (Tzanakakis, 2003).

Η οικονομική ζημία που προκαλεί η ωοαπόθεση των δάκων στην ελιά περιλαμβάνει την πτώση των καρπών λόγω της ανάπτυξης των προνυμφών, τη μείωση της παραγωγής λαδιού καθώς και τη μειωμένη ποιότητα και αξία του λαδιού λόγω της αυξημένης οξύτητας (Daane and Johnson, 2010). Υπολογίζεται ότι ο δάκος της ελιάς ευθύνεται για το 5% της ζημίας στη

συνολική παραγωγή λαδιού, προκαλώντας απώλεια 800 εκατομμυρίων δολαρίων το χρόνο (Nardi et al., 2005).

Ο έλεγχος του δάκου βασίζεται κυρίως στη χρήση εντομοκτόνων, κυρίως οργανοφωσφορικών (OP), χρησιμοποιώντας τα σε παγίδες μυγών και ψεκασμούς εδαφών, επιφέροντας γρήγορη και υψηλή θνησιμότητα στα έντομα. Ωστόσο, τα οργανοφωσφορικά είναι εξαιρετικά ερεθιστικά για τους ανθρώπους, επικίνδυνα για το περιβάλλον, τοξικά για τις μέλισσες και επιβλαβή για τα ζώα, τα πουλιά και τους υδάτινους οργανισμούς (Pontikakos et al., 2012). Η εκτεταμένη χρήση των εντομοκτόνων οδηγεί στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας των πληθυσμών του δάκου, ειδικά αν χρησιμοποιείται μόνο μια ομάδα εντομοκτόνων τα οποία έχουν κοινό τρόπο δράσης, καθιστώντας επιτακτική την ανάγκη για νέους τρόπους ελέγχου του δάκου (Skouras et al., 2007).

2. Σκοπός

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία σκοπός είναι ο σχεδιασμός και η κατασκευή των κατάλληλων φορέων που θα περιέχουν όλες τις απαραίτητες αλληλουχίες για τον γενετικό μετασχηματισμό του εντόμου *B. oleae* και τον τεμαχισμό του Χ χρωμοσώματος του δάκου της ελιάς κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης με χρήση του συστήματος CRISPR. Οι φορείς μετασχηματισμού που θα δημιουργηθούν πρέπει να φέρουν τις γενετικές κατασκευές που θα εξασφαλίζουν την έκφραση των ενδονουκλεασών Cas9 και Cpf1 κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, των gRNA, αλλά και ενός γονιδίου-δείκτη μετασχηματισμού.

Η περαιτέρω κλωνοποίηση των κατάλληλων αλληλουχιών sgRNA στους φορείς που θα δημιουργηθούν και η μεταφορά τους σε έμβρυα του δάκου μέσω μικροενέσεων σε μελλοντικές προσπάθειες θα οδηγήσει τελικά στη δημιουργία αρσενικών διαγονιδιακών μυγών ως μια εναλλακτική λύση στη μείωση του πληθυσμού του δάκου.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Μέθοδοι ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων

3.1.1 Συμβατική PCR

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια *in vitro* μέθοδος ενίσχυσης του DNA που δημοσιεύτηκε για πρώτη φορά το 1985 και επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό της επιθυμητής αλληλουχίας-στόχου σε πολλά αντίγραφα. Πλέον, η PCR θεωρείται μια τεχνική κλειδί για τη μοριακή βιολογία και καθώς η βασική διαδικασία έχει τροποποιηθεί και διευρυνθεί για αρκετά προβλήματα, πλέον έχει πολλές εφαρμογές στην επιστημονική έρευνα, στη μοριακή διαγνωστική, στην εγκληματολογία και στην παλαιοντολογία.

Η αρχή της μεθόδου αποτελεί μια απλουστευμένη εκδοχή της φυσιολογικής διαδικασίας της αντιγραφής του DNA που συμβαίνει κατά την κυτταρική μιτωτική διαίρεση, κατά την οποία ένα αντίγραφο του γενώματος δημιουργείται για κάθε νέο σωματικό κύτταρο. Αυτή η διαδικασία διπλασιάζει την ποσότητα του DNA, η οποία μοιράζεται ισόποσα μεταξύ των δύο νέων κυττάρων. Ο διπλασιασμός του πυρηνικού DNA συμβαίνει σε κάθε κυτταρική διαίρεση όπως ένα πολυκύτταρος οργανισμός δημιουργείται μέσω συνεχών κυτταρικών διαιρέσεων εκκινώντας από ένα μόνο προγονικό κύτταρο. Το μοναδικό αντίγραφο γονιδιώματος στο αρχικό προγονικό κύτταρο μετατρέπεται σε πολλά δισεκατομμύρια αντίγραφα στον πλήρη ώριμο οργανισμό. Η PCR βασίζεται σε παρόμοιες αρχές και απομονωμένα στοιχεία αυτής της διαδικασίας μετατρέπουν μικρές ποσότητες DNA σε υψηλές ποσότητες.

Η PCR βασίζεται στην ενζυμική επαναλαμβανόμενη αντιγραφή ενός τμήματος DNA-στόχου, γνωστής ή άγνωστης αλληλουχίας, χρησιμοποιώντας 2 συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια γνωστής αλληλουχίας που ονομάζονται εκκινητές (*primers*) οι οποίοι λειτουργούν ως εκκινητικά μόρια για τη δημιουργία συμπληρωματικών κλώνων με βάση ένα εκμαγείο DNA (μήτρα) και μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, η οποία ενισχύει τους συμπληρωματικούς κλώνους με την προσθήκη δεοξυριβονουκλεοτιδίων.

Τα βασικά συστατικά που απαιτούνται για μια αντίδραση PCR είναι τα εξής:

- Τη μήτρα DNA που περιέχει την περιοχή στόχο για ενίσχυση.
- Μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση που να είναι σταθερή και να διατηρεί την δραστηρότητά της σε υψηλές θερμοκρασίες. Συνήθως χρησιμοποιείται η Taq πολυμεράση, η οποία απομονώθηκε από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus*.

- Δύο εκκινητές (18-22 βάσεων) που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, ο καθένας αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση.
- Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), που αποτελούν απαραίτητα δομικά στοιχεία για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας του DNA.
- Κατάλληλη συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+} που χρησιμοποιούνται από την πολυμεράση ως μεταλλικός συμπαράγοντας.
- Ένα ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) ώστε να παρέχει το κατάλληλο χημικό περιβάλλον (ιοντική ισχύ και pH) για τη δράση της πολυμεράσης.

Μια αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά.

- 1^ο στάδιο (Αποδιάταξη) : Οι δύο αλυσίδες διαχωρίζονται, το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95° C για περίπου 30 δευτερόλεπτα.
- 2^ο στάδιο (Υβριδισμός εκκινητών) : Οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές αλληλουχίες εκατέρωθεν του DNA στόχου με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65° C για περίπου 1 λεπτό. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης (T_a) εξαρτάται από την θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (T_m).
- 3^ο στάδιο (Επιμήκυνση) : Η Taq πολυμεράση επιμηκύνει τους εκκινητές εισάγοντας dNTPs και χρησιμοποιώντας την συμπληρωματική αλυσίδα του DNA ως εκμαγείο σε θερμοκρασία 72-74° C για 30 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό.

Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε αυτοματοποιημένες συσκευές, τους θερμοκυκλοποιητές, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν τη θερμοκρασία σε κάθε στάδιο με ταχύτητα και ακρίβεια. Συνήθως μια PCR πραγματοποιείται επί 25-35 κύκλους. Ο υπολογισμός των τελικών μορίων DNA που παράγονται από ένα μόριο αρχικού DNA είναι 2^n , όπου n είναι οι κύκλοι της PCR. Ωστόσο, ο υπερβολικός αριθμός κύκλων μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση μη ειδικών προϊόντων.

Υλικά

- DNA μήτρα
- Εκκινητές (Forward και Reverse)
- Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (Kapa Hifi Fidelity Buffer)
- dNTPs
- Taq DNA πολυμεράση (Kapa Hifi Taq)
- ddH₂O

Μέθοδος

1. Σε PCR tubes προστίθενται οι κατάλληλες ποσότητες αντιδραστηρίων.
2. Τα δείγματα τοποθετούνται στον θερμοκυκλοποιητή, ο οποίος έχει ρυθμιστεί με το κατάλληλο πρόγραμμα για τον αριθμό των κύκλων και τη θερμοκρασία κάθε σταδίου.

Πίνακας 3.1 Τα αντιδραστήρια και οι τελικές συγκεντρώσεις της συμβατικής PCR

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση
DNA μήτρα (template)	10-40 ng
Buffer	1X
dNTPs	0,3 mM each
Forward primer	0,3 μM
Reverse primer	0,3 μM
Taq πολυμεράση	0,5 u
ddH ₂ O	Συμπληρώνει τον όγκο
Τελικός όγκος	20 μl

Πίνακας 3.2 Τυπικές συνθήκες μιας συμβατικής PCR

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95° C	3 min	1
Αποδιάταξη	98° C	20 sec	30
Υβριδισμός εκκινητών	60° C	15 sec	
Επιμήκυνση	72° C	30 sec	
Τελική επιμήκυνση	72° C	1 min	1
Συντήρηση	4° C		

3.1.2 Overhang PCR

Η Overhang PCR είναι μια τεχνική ενίσχυσης με την οποία συγχρόνως μπορεί να επιμηκύνεται η περιοχή-στόχος, προσθέτοντας στα άκρα της μικρές αλληλουχίες. Είναι μια εύκολη τεχνική για να προστίθενται αλληλουχίες αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού, σε ένα προϊόν PCR ώστε να διευκολυνθεί η διαδικασία κλωνοποίησης σε ένα πλασμίδιο.

Η Overhang PCR λειτουργεί όπως μια συμβατική PCR και διαφέρει με αυτή στον σχεδιασμό των εκκινητών. Οι εκκινητές σχεδιάζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να έχουν μία πρόσθετη προεξέχουσα (overhang) αλληλουχία στο 5' άκρο, η οποία θα ενσωματωθεί στο τελικό προϊόν της PCR. Κατά τον πρώτο κύκλο της PCR, στο στάδιο του υβριδισμού των εκκινητών, το 3' άκρο των εκκινητών θα υβριδοποιηθεί στις συμπληρωματικές αλληλουχίες της μήτρας DNA, έχοντας προεξέχοντες ουρές νουκλεοτιδίων στο 5' άκρο τους. Στους επόμενους κύκλους η ενίσχυση των αλυσίδων, θα περιέχει και τη νέα αλληλουχία DNA. Ο σχεδιασμός

των εκκινητών θέλει προσοχή ώστε να υπάρχουν αρκετά νουκλεοτίδια (τουλάχιστον τα μισά) στο 3' άκρο, τα οποία θα υβριδοποιηθούν αποτελεσματικά στη μήτρα DNA.

Μέθοδος

1. Σε PCR tubes προστίθενται οι κατάλληλες ποσότητες αντιδραστηρίων.
2. Τα δείγματα τοποθετούνται στον θερμοκυκλοποιητή, ο οποίος έχει ρυθμιστεί με το κατάλληλο πρόγραμμα για τον αριθμό των κύκλων και τη θερμοκρασία κάθε σταδίου.

Πίνακας 3.3 Τα αντιδραστήρια και οι τελικές συγκεντρώσεις της overhang PCR

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση
DNA μήτρα (template)	10-40 ng
Buffer	1X
dNTPs	0,3 mM each
Forward primer	0,3 μM
Reverse primer	0,3 μM
Taq πολυμεράση	0,5 u
ddH ₂ O	Συμπληρώνει τον όγκο
Τελικός όγκος	20 μl

Πίνακας 3.4 Τυπικές συνθήκες μιας overhang PCR

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95° C	3 min	1
Αποδιάταξη	98° C	20 sec	30
Υβριδισμός εκκινητών	60° C	15 sec	
Επιμήκυνση	72° C	30 sec	
Τελική επιμήκυνση	72° C	1 min	1
Συντήρηση	4° C		

3.2 Τεχνικές κλωνοποίησης

3.2.1 Μετασηματισμός βακτηρίων

Ο μετασηματισμός βακτηρίων είναι η διαδικασία εισαγωγής πλασμιδίων στα βακτήρια. Η διαδικασία αυτή τυπικά περιλαμβάνει την προετοιμασία των δεκτικών κυττάρων, τον μετασηματισμό τους με το επιθυμητό DNA-ένθεμα, την περίοδο ανάκαμψης των κυττάρων

και την επίστρωση των κυττάρων σε στερεό θρεπτικό υλικό για την ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων κλώνων. Κριτήριο διαχωρισμού των βακτηρίων που μετασχηματίστηκαν αποτελεί η αντοχή σε κάποιο αντιβιοτικό που παρέχεται από το πλασμίδιο που εισάχθηκε. Ο μετασχηματισμός μπορεί να είναι φυσικός και πετυχαίνεται με ηλεκτροδιάτρηση ή χημικός με θερμικό σοκ όπως χρησιμοποιήθηκε σε αυτήν την περίπτωση επηρεάζοντας το pH.

Υλικά

- Δεκτικά κύτταρα DH5a
- Πλασμιδιακό DNA
- Θρεπτικό μέσο SOC

Μέθοδος

1. Προσθήκη 2 μl πλασμιδίου σε 100 μl χημικών κυττάρων DH5a (*E.coli*) σε erpendorf tube .
2. Τοποθέτηση του tube για 30 λεπτά στον πάγο, έπειτα για 90 δευτερόλεπτα στους 42°C (heat shock) στο υδατόλουτρο και ακολούθως για 2 λεπτά στον πάγο.
3. Μεταφορά σε γυάλινο σωλήνα, προσθήκη 900 μl θρεπτικού μέσου SOC και επώαση για 1 ώρα στους 37°C υπό ανάδευση (στροφές < 180).
4. Τα συνολικά 1000 μl μοιράζονται σε δύο erpendorf, στο ένα 200 μl και στο άλλο 800 μl.
5. Φυγοκέντρηση του erpendorf με τα 800 μl για 2 λεπτά στα 2000 rpm.
6. Αφαίρεση 600 μl από το υπερκείμενο.
7. Επίστρωση των 200 μl που απομένουν και τα αρχικά 200 μl (χωρίς φυγοκέντρηση) σε 2 τρυβλία αντίστοιχα.
8. Επώαση των τρυβλίων σε θερμοκρασία 37°C για 12-16 h.

3.2.2 Στερεή καλλιέργεια

Η στερεή καλλιέργεια είναι ένας εύκολος τρόπος για ανάπτυξη και διαχωρισμό βακτηριών ή μικροοργανισμών ενδιαφέροντος χρησιμοποιώντας απλά ένα τρυβλίο Petri το οποίο περιέχει θρεπτικό μέσο με άγαρ, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη στερεοποίησή του. Όταν ένας μικροοργανισμός θα ακουμπήσει στο πιάτο θα αναπτυχθεί σε μεμονωμένες αποικίες και κάθε κλώνος θα είναι πανομοιότυπος με τον μικροοργανισμό πρόγονό του. Στο θρεπτικό μέσο πριν σταθεροποιηθεί προστίθενται τα κατάλληλα αντιβιοτικά για να απομονωθούν στη συνέχεια τα μετασχηματισμένα βακτήρια βάσει της ανθεκτικότητάς τους στα συγκεκριμένα αντιβιοτικά. Τα βακτήρια που δεν έχουν προσλάβει το κατάλληλο πλασμίδιο, δεν αναπτύσσονται και πεθαίνουν. Αυτή η μέθοδος είναι ένας εύκολος τρόπος ταυτοποίησης των βακτηρίων που μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο ενδιαφέροντος.

Υλικά

- Τρυβλία με θρεπτικό μέσο LB agar και καναμυκίνη
- Βακτήρια

Μέθοδος

1. Επίστρωση 200 μl μετασχηματισμένων κυττάρων σε τρυβλία LB-broth που περιέχουν καναμυκίνη.
2. Επώαση των τρυβλίων σε θερμοκρασία 37°C για 12-16 h.

Η επίστρωση των τρυβλίων γίνεται πάντα σε ασηπτικές συνθήκες.

3.2.3 Υγρή καλλιέργεια

Η υγρή καλλιέργεια είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιεί υγρό θρεπτικό μέσο ώστε να αναπτυχθούν γρήγορα και αποτελεσματικά μεγάλες ποσότητες βακτηρίων που χρειάζονται για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA για μελλοντική πειραματική χρήση. Αυτή η μέθοδος είναι ικανή να υποστηρίξει μεγαλύτερη πυκνότητα βακτηρίων από την στερεή καλλιέργεια.

Υλικά

- Θρεπτικό μέσο LB
- Αποικία βακτηρίων
- Κατάλληλο αντιβιοτικό (καναμυκίνη)

Μέθοδος

1. Προσθήκη 3 ml LB broth με καναμυκίνη σε γυάλινο σωλήνα.
2. Ενοφθαλμισμός του υγρού θρεπτικού μέσου στο σωλήνα με μια μεμονωμένη αποικία από τη στερεή καλλιέργεια.
3. Ολονύχτια επώαση στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm).

3.2.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (*mini preps*)

Ο σκοπός αυτής της διαδικασίας είναι η απομόνωση του μικρού πλασμιδιακού DNA από τα βακτήρια. Αρχικά γίνεται η λύση των βακτηρίων και ακολουθεί ο καθαρισμός όπου το πλασμιδιακό DNA διαχωρίζεται από τις πρωτεΐνες και το βακτηριακό χρωμοσωμικό DNA. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η αλκαλική λύση, η οποία είναι η πιο συνήθης από την ενζυματική λύση ή τη χημική λύση.

Υλικά

- Υγρή καλλιέργεια μετασηματισμένων βακτηρίων
- Solution I (GET)
- Solution II (alkali)
- Solution III (οξικό κάλιο)
- Αιθανόλη 100%
- Αιθανόλη 70%
- ddH₂O

Μέθοδος

1. Μεταφορά 1.5 ml βακτηριακής καλλιέργειας σε errendorf tubes.
2. Φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στα 4000 rpm. Αφαίρεση του υπερκειμένου και τοποθέτηση των tubes με το ίζημα (βακτήρια) στον πάγο.
3. Προσθήκη 100μl παγωμένου διαλύματος GET (solution I). Ανάδευση 1 λεπτό και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προσθήκη 200μl διαλύματος alkali (solution II). Ανακίνηση, αναποδογυρίζοντας το errendorf (5 φορές) και επώαση στον πάγο για 3-5 λεπτά.
5. Προσθήκη 150 μl παγωμένου διαλύματος οξικού καλίου (solution III). Ανάδευση και επώαση στον πάγο για 8-10 λεπτά.
6. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα στροφών rpm. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο errendorf.
7. Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης (ή 2,5 V αιθανόλης 100%), ανάδευση για λίγα δευτερόλεπτα και επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα στροφών rpm και αφαίρεση υπερκειμένου.
9. Προσθήκη 0,5 V αιθανόλη 70% και ανακίνηση αναποδογυρίζοντάς το errendorf. Επανάληψη του βήματος 8.
10. Στέγνωμα του ιζήματος στον απαγωγό και αναδιάλυσή του σε ddH₂O. Διατήρηση στους 4°C.

3.2.5 Πέψη φορέα με ένζυμο περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού αποτελούν ένζυμα που φυσιολογικά εντοπίζονται στα βακτήρια και στα αρχαία και έχουν φυσιολογικό ρόλο στην άμυνα του μικροοργανισμού απέναντι σε ιούς. Τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν αλληλουχίες μερικών νουκλεοτιδίων και πέπτουν σε μια θέση που ονομάζεται θέση περιορισμού, δημιουργώντας είτε συμπληρωματικά, είτε τυφλά άκρα. Λόγω αυτής της ιδιότητας τους χρησιμοποιούνται πολύ για την απομόνωση γονιδίων και στην κλωνοποίηση.

Η πέψη ενός φορέα, πλασμιδιακού ή μη, με ένζυμο περιορισμού αποτελεί μια πολύ χρήσιμη δοκιμασία η οποία έχει ως στόχο την επιβεβαίωση ύπαρξης ενθέματος εντός του φορέα. Η διαπίστωση της ύπαρξης ή μη ενθέματος μπορεί να γίνει από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε ένα πήκτωμα αγαρόζης, το οποίο αποκαλύπτει το πλήθος και το μέγεθος των προϊόντων.

Υλικά

- Φορέας
- Ένζυμο περιορισμού (15 u/ml)
- Buffer (10X)
- ddH₂O

Μέθοδος

1. Σε PCR tube προστίθενται οι κατάλληλες ποσότητες των αντιδραστηρίων.
2. Επώαση στο υδατόλουτρο στους 37°C για όση ώρα χρειάζεται.

Πίνακας 3.5 Ενδεικτικό set up μιας πέψης με το ένζυμο EcoRI

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
Φορέας (DNA)	2 μl
Ένζυμο περιορισμού	0,5 μl
Buffer	1,5 μl
ddH ₂ O	11 μl
Τελικός όγκος	15 μl

Ανάλογα με το μέγεθος του φορέα και το ένζυμο περιορισμού η ώρα επώασης διαφέρει.

3.2.6 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA (Ligation)

Κατά την αντίδραση σύνδεσης πραγματοποιείται εισαγωγή του επιθυμητού ενθέματος στον φορέα. Πρόκειται για μια διαμοριακή αντίδραση στην οποία το ένα άκρο ενός γραμμικού φορέα συνδέεται με το ένα άκρο του ενθέματος με τη δράση DNA λιγάσης για το σχηματισμό μιας γραμμικής DNA χίμαιρας και ακολουθεί από κυκλοποίηση με την πρόσδεση των δύο εναπομείναντων άκρων. Η σύνδεση πραγματοποιείται με τον σχηματισμό τεσσάρων φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ των 5' φωσφορικών καταλοίπων

(5'-P) και των 3' υδροξυλομάδων (3'-OH) στην περίπτωση που ο φορέας δεν έχει υποστεί αποφωσφορυλίωση (διαφορετικά σχηματίζονται δύο δεσμοί).

Σε μία αντίδραση σύνδεσης, ο μοριακός λόγος DNA/φορέα (δηλαδή ο μοριακός λόγος των μορίων του ενθέματος DNA προς τα μόρια του φορέα μπορεί να κυμαίνεται από 1:1 έως 8:1. Η ποσότητα του DNA που απαιτείται υπολογίζεται από τον τύπο: $ng\ DNA = ng\ φορέα \times a \times b$, όπου a ο μοριακός λόγος DNA/φορέα και b ο λόγος μεγέθους DNA/φορέα.

Υλικά

- Ένθεμα (Bo-U6P-Bsal-Cas9scaffold-SacII)
- Φορέας (pBacKTT010-Cas9)
- T4 λιγάση NEB
- Buffer T4 λιγάσης (10X with 10mM ATP)

Μέθοδος

1. Προσθήκη των αντιδραστηρίων και του DNA σε σωλήνα 0.2 ml τύπου.
2. Επώαση στους 22°C για 2 ώρες και έπειτα στους 16°C για όλη τη νύχτα.

Πίνακας 3.6 To set up της αντίδρασης λιγάσης σε αναλογία 5:1

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
Ένθεμα	11,02 ng
Φορέας	65 ng
Buffer	1X
T4 λιγάση	1,5 μ
Τελικός όγκος	20 μ l

3.3 Τεχνικές χειρισμού νουκλεϊκών οξέων

3.3.1 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μια απλή και αποτελεσματική μέθοδος για διαχωρισμό, ταυτοποίηση και ποιοτικό προσδιορισμό μορίων όπως νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) και πρωτεϊνών. Κατά την ηλεκτροφόρηση τα φορτισμένα μόρια μετακινούνται υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, η κατεύθυνση των οποίων εξαρτάται από το

φορτίο και η ταχύτητά τους εξαρτάται από το μέγεθος. Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που πολυμερίζεται για να σχηματίσει το πήκτωμα (gel) δια μέσου του οποίου διαχωρίζονται τα μόρια που μας ενδιαφέρουν. Η αγαρόζη σχηματίζει πόρους μέσω των οποίων κινούνται τα μόρια, η συγκέντρωση της οποίας καθορίζει το μέγεθος των πόρων και συνεπώς τη διαχωριστική ικανότητα των μορίων. Έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός μορίων που διαφέρουν μεταξύ τους ελάχιστα σε μήκος. Παράλληλα χρησιμοποιείται ένας μάρτυρας νουκλεοτιδικών βάσεων γνωστού μοριακού βάρους (ladder) για τη σύγκριση των δειγμάτων με σκοπό την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση τους.

Υλικά

- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 5X (1L: 54g Tris-base, 20mL EDTA 0,5M (pH:8), 27,5g Boric acid)
- Αγαρόζη
- Μάρτυρας νουκλεοτιδικών βάσεων (Ladder)
- Χρωστική φόρτωσης δειγμάτων (Loading buffer) 10X
- Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)

Μέθοδος

Για την παρασκευή 100mL πηκτώματος αγαρόζης 1%, 0,5X TBE ακολουθούνται τα εξής βήματα:

1. Προσθήκη 1gr αγαρόζης σε κωνική φιάλη.
2. Προσθήκη 100ml TBE στην ίδια φιάλη.
3. Θέρμανση της κωνικής φιάλης, με ανάδευση ανά τακτά διαστήματα, έως ότου διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη.
4. Το διάλυμα ψύχεται σε τρεχούμενο νερό για να μειωθεί η θερμοκρασία στους 40-50 °C.
5. Προσθήκη 3-4μl βρωμιούχου αιθυδίου και ανακίνηση.
6. Εισαγωγή του διαλύματος αγαρόζης στις ειδικές μήτρες και τοποθέτηση χτενών για τη δημιουργία μικρών πηγαδιών εντός του πηκτώματος στα οποία θα τοποθετηθούν τα δείγματα.
7. Το διάλυμα αφήνεται να στερεοποιηθεί πλήρως (περίπου για 30 λεπτά) και στη συνέχεια αφαιρούνται προσεκτικά τα «χτενάκια».

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων

1. Τοποθέτηση του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
2. Προσθήκη διαλύματος TBE 0,5X ώστε να καλυφθούν πλήρως τα πηγαδάκια της ηλεκτροφόρησης.
3. Προσθήκη διαλύματος φόρτωσης στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα για να γίνουν ορατά και να καθιζάνουν εύκολα στα πηγαδάκια.
4. Εισαγωγή των δειγμάτων καθώς και του ladder στα διαφορετικά πηγαδάκια του πηκτώματος.
5. Σύνδεση ηλεκτροδίων με κατάλληλη τροφοδοτική συσκευή, ρύθμιση της τάσης (90-100V) και εφαρμογή για ~40 λεπτά.

Για την παρατήρηση του αποτελέσματος των ζωνών, το πήκτωμα μεταφέρεται σε συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).

3.3.2 Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης (Gel extraction)

Η ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης είναι μια μέθοδος που στοχεύει στην απομόνωση και στον καθαρισμό των τμημάτων DNA που έχουν διαχωριστεί σε ένα πήκτωμα αγαρόζης με σκοπό να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω σε άλλες αντιδράσεις, όπως για παράδειγμα σε αλληλούχηση, PCR, αντίδραση σύνδεσης. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το NucleoSpin Gel and PCR clean-up kit (Macherey-Nagel).

Υλικά

- NT1 buffer
- NT3 buffer
- ddH₂O
- Επιθυμητή ζώνη DNA που διαχωρίστηκε σε πήκτωμα αγαρόζης

Μέθοδος

1. Κοπή της ζώνης που περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA από το πήκτωμα αγαρόζης με τη βοήθεια νυστεριού και τοποθέτηση του σε eppendorf tube.
2. Προσδιορισμός βάρους του κομματιού του πηκτώματος.
3. Προσθήκη 200 μl διαλύματος NT1 για κάθε 100 mg πηκτώματος.
4. Επώαση του δείγματος για 5-10 λεπτά στους 50°C στο υδατόλουτρο, ανάδευση κάθε 2-3 λεπτά αυτού μέχρι να γίνει πλήρης διαλυτοποίηση του κομματιού του πηκτώματος.

5. Τοποθέτηση μιας στήλης (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column) μέσα σε ένα σωληνάκι συλλογής (Collection Tube) 2 ml και φόρτωση σε αυτήν του δείγματος μέχρι τα 700 µl.
6. Φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 11000 g.
7. Απόρριψη του εκλούσματος.
8. Επανατοποθέτηση της στήλης στο σωληνάκι συλλογής και φόρτωση του εναπομείναντος δείγματος αν έχει περισσέψει. Επανάληψη της φυγοκέντρησης και της απόρριψης διηθήματος.
9. Προσθήκη 700 µl διαλύματος NT3 στη στήλη. Φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 11.000 g. Απόρριψη του εκλούσματος και τοποθέτηση της στήλης στο σωληνάκι.
10. Επανάληψη του προηγούμενου βήματος για καλύτερο καθαρισμό.
11. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11000 g για να απομακρυνθεί πλήρως το διάλυμα NT3. Στέγνωμα της στήλης πλήρως.
12. Τοποθέτηση της στήλης σε νέο erpendorf σωληνάκι 1,5 ml. Προσθήκη 25 µl προθερμασμένου νερού στο κέντρο της στήλης και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (18°C-25°C) για 1 λεπτό. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11000 g.

3.3.3 Ποσοτικοποίηση DNA-Quawell UV Spectrophotometer

Η συγκέντρωση του DNA που θα χρησιμοποιηθεί στις αντιδράσεις PCR θα πρέπει να είναι γνωστή και σταθερή, ώστε κάθε αντίδραση να περιλαμβάνει τη βέλτιστη ποσότητα μήτρας DNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το Q3000 UV Spectrophotometer (Quawell), το οποίο υπολογίζει την συγκέντρωση του DNA στο εκάστοτε δείγμα

Το Quawell Q3000 είναι ένα μικρών όγκων φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ακτινοβολίας, ειδικά σχεδιασμένο για τη μέτρηση νουκλεϊκών οξέων και καθαρών πρωτεϊνών. Χρησιμοποιώντας μια μοναδική τεχνολογία που συγκρατεί δείγματα 1,5-2,5µl μεταξύ των άνω και κάτω οπτικών επιφανειών, το Q3000 έχει τη δυνατότητα να μετρήσει τη συγκέντρωση ενός δείγματος σε λιγότερο από 2 δευτερόλεπτα με υψηλό βαθμό ακρίβειας και επαναληψιμότητας.

Υλικά

- Δείγμα DNA προς μέτρηση
- ddH₂O

Μέθοδος

Τα βήματα για να πραγματοποιηθεί η μέτρηση είναι τα εξής:

1. Ανασήκωση του άνω βραχίονα.
2. Τοποθέτηση 1-2 μl νερού στην υποδοχή.
3. Ο άνω βραχίονας κατεβαίνει.
4. Επιλογή με κλικ στο κουμπί "Blank" για μέτρηση του «τυφλού» δείγματος.
5. Ανασήκωση του άνω βραχίονα και απομάκρυνση του νερού από τις δύο επιφάνειες μέτρησης.
6. Τοποθέτηση 1-2 μl δείγματος στην υποδοχή.
7. Επαναφορά του άνω βραχίονα στη θέση μέτρησης.
8. Κλικ στο κουμπί "Μέτρηση" και το Q3000 εμφανίζει τα δεδομένα.

3.4 Βιοπληροφορικές μέθοδοι

3.4.1 Benchling

Η πλατφόρμα Benchling είναι ένα διαδικτυακό εργαλείο γραφικής αναπαράστασης και επεξεργασίας νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών. Το περιβάλλον εργασίας προσφέρει εύκολη πρόσβαση και διαχείριση των αλληλουχιών. Με την εισαγωγή μιας επιθυμητής αλληλουχίας το πρόγραμμα υπολογίζει το μήκος της αλληλουχίας και προσφέρει πολλές δυνατότητες όπως επισήμανση επιλεγμένων τμημάτων και προσθήκη ετικετών με διάφορα χρώματα, προσθήκη εκκινήτων με απεικόνιση της κατεύθυνσής τους, πιθανά σημεία αναγνώρισης από ένζυμα περιορισμού. Μερικές από τις δυνατότητες που προσφέρει είναι ευθυγράμμιση αλληλουχιών και υπολογισμός των mismatches, *in silico* πέψεις με ένζυμα περιορισμού και απεικόνιση των προϊόντων αυτών.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των αλληλουχιών της κατασκευής για την έκφραση του sgRNA/Cas9.

3.4.2 IDT Primer Quest Tool

Το Primer Quest Tool είναι ένα εργαλείο της IDT (Integrated DNA Technologies) για τον σχεδιασμό εκκινήτων. Με την εισαγωγή της επιθυμητής αλληλουχίας προς ενίσχυση και με τις κατάλληλες τροποποιήσεις των παραμέτρων, το εργαλείο αυτό εμφανίζει πιθανά ζεύγη

εκκινητών για PCR, qPCR ή αλληλούχηση. Η εισαγωγή της αλληλουχίας μπορεί να γίνει σε μορφή FASTA ή δηλώνοντας το Genbank ή το Accession ID αυτής. Το πρόγραμμα προσφέρει 4 επιλογές σχεδίασης με βάση συνήθεις πειραματικές διατάξεις (setups). Η προεπιλογή του προγράμματος θα εμφανίσει τα 5 καλύτερα αποτελέσματα. Σε κάθε επιλογή σχεδίασης δίνεται η δυνατότητα της τροποποίησης των παραμέτρων και μία επιλογή εξ' ολοκλήρου εξατομικευμένης προσαρμογής στις επιθυμητές ανάγκες του πειράματος όπως η συγκέντρωση των ιόντων Mg^{+2} , το ποσοστό σε συγκέντρωση GC των εκκινητών και πολλές άλλες παράμετροι (~ 45).

Στην παρούσα εργασία το πρόγραμμα αξιοποιήθηκε για τον σχεδιασμό των εκκινητών (βλ. Παράρτημα) που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις overhang PCR για τη σταδιακή ενίσχυση και σύνθεση των αλληλουχιών της κατασκευής για την έκφραση του sgRNA/Cpf1.

3.4.3 Oligoanalyzer Tool

Το Oligoanalyzer Tool είναι ένα ακόμη online εργαλείο της IDT για την ανάλυση της δομής ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Συγκεκριμένα με την εισαγωγή του προς εξέταση ολιγονουκλεοτιδίου παρέχονται πληροφορίες με τις φυσικές ιδιότητες του όπως το μήκος του, η συμπληρωματική αλληλουχία του, η θερμοκρασία αποδιάταξης (T_m), το ποσοστό σε συγκέντρωση GC κ.α. Ακόμη μπορεί να προβλεφτεί ο πιθανός σχηματισμός δευτεροταγών δομών θηλιάς (hairpin) και ομοδιμερών καθώς και να ελεγχθεί η σταθερότητά τους. Σε περίπτωση ύπαρξης πάνω από μίας αλληλουχίας όπως σε ένα ζευγάρι εκκινητών, ελέγχεται ο σχηματισμών ετεροδιμερών.

Οι παράμετροι αφορούν τη θερμοκρασία αποδιάταξης ($T_m > 50^\circ C$), την τιμή της ελεύθερης ενέργειας ($\Delta G > -10$) των δευτεροταγών δομών θηλιάς (hairpin) και των ομο- και ετεροδιμερών που σχηματίζουν τα ζεύγη των εκκινητών.

Το εργαλείο αυτό χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των εκκινητών που σχεδιάστηκαν ώστε να εξασφαλιστεί η μέγιστη δυνατή απόδοση των αντιδράσεων ενίσχυσης.

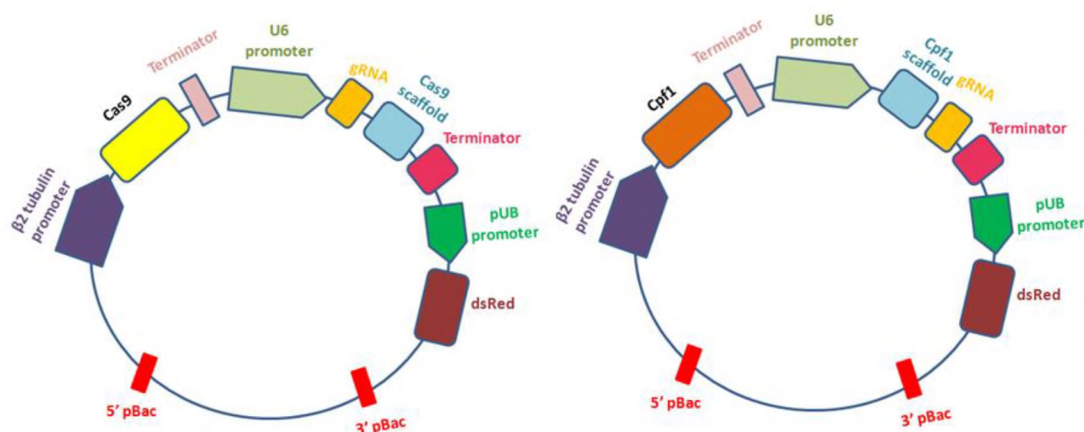
4. Αποτελέσματα

4.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία σκοπός είναι η κατασκευή των κατάλληλων φορέων που θα περιέχουν όλες τις απαραίτητες αλληλουχίες για τον γενετικό μετασχηματισμό του εντόμου *Bactrocera oleae* και την εφαρμογή του συστήματος X-shredding. Οι αλληλουχίες που θα περιέχονται πρέπει να εξασφαλίζουν την ενσωμάτωση στο γονιδίωμα του δάκου και περαιτέρω να είναι ικανές να προκαλέσουν τον τεμαχισμό του X χρωμοσώματος κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης.

Ο φορέας που θα χρησιμοποιηθεί είναι ο *riggyBac* και ο οποίος θα πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες αλληλουχίες: μια ενδονουκλεάση του συστήματος CRISPR, τις ρυθμιστικές αλληλουχίες για την έκφραση της ενδονουκλεάσης κατά τη σπερματογένεση δηλαδή τον υποκινητή της β2 τουμπουλίνης και τον τερματιστή, τα 5' και 3' άκρα του *riggyBac*, την αλληλουχία του guide RNA μαζί με το scaffold, τις ρυθμιστικές αλληλουχίες για την έκφραση του gRNA καθώς και τον δείκτη dsRed με τις ρυθμιστικές του αλληλουχίες για την έκφραση της φθορίζουσας πρωτεΐνης dsRed

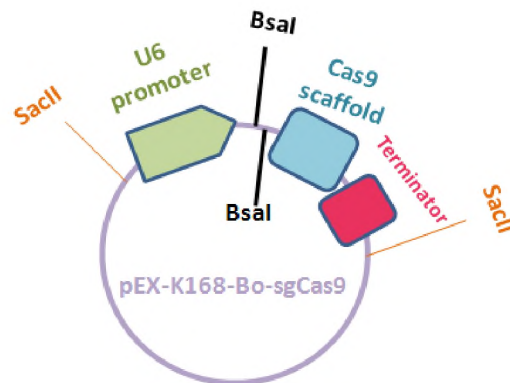
Όσον αφορά τη χρήση του συστήματος CRISPR, πρόκειται να δημιουργηθούν δύο διακριτές κατασκευές, οι οποίες θα βασίζονται στις ενδονουκλεάσες Cas9 και Cpf1 αντίστοιχα (Εικ. 4.1). Και στις δύο περιπτώσεις επειδή ο τελικός φορέας έχει πολύ μεγάλο μέγεθος για μεγαλύτερη ευκολία κάθε τμήμα των κατασκευών επεξεργάζεται ξεχωριστά.



Εικόνα 4.1 Σχηματική απεικόνιση των αναμενόμενων τελικών φορέων *riggyBac*

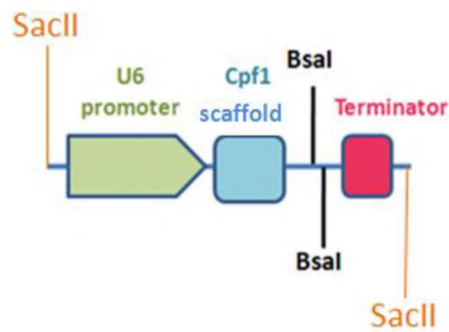
Ανάλογα με την κάθε ενδονουκλεάση, θα ακολουθήσουν διαφορετικές προσεγγίσεις στην επεξεργασία των κατασκευών. Στην πρώτη προσέγγιση που αφορά την Cas9, θα χρησιμοποιηθεί το συνθετικό πλασμίδιο Rex-K168-Bo-sgCas9 (Εικ. 4.2) στο οποίο υπάρχουν ήδη οι εξής αλληλουχίες: ο υποκινητής U6P, δύο εν σειρά αντιπαράλληλες θέσεις

αναγνώρισης BsaI, το σταθερό τμήμα (scaffold) του gRNA και ο τερματιστής U6T. Εκατέρωθεν υπάρχουν δύο θέσεις αναγνώρισης SacII για την κλωνοποίηση του τμήματος στον τελικό φορέα.



Εικόνα 4.2 Σχηματική απεικόνιση των αλληλουχιών ενδιαφέροντος του πλασμιδίου pEX-K168-Bo-sgCas9

Στη δεύτερη προσέγγιση που αφορά την Cpf1, με μήτρα το πλασμίδιο pEX-K168-Bo-sgCas9 που χρησιμοποιήθηκε για την Cas9 και τους κατάλληλους εκκινητές θα απομονωθεί ο υποκινητής U6P και στη συνέχεια με διαδοχικές Overhang PCR θα προστεθούν όλες οι αλληλουχίες ενδιαφέροντος όπως φαίνεται στην εικόνα 4.3.

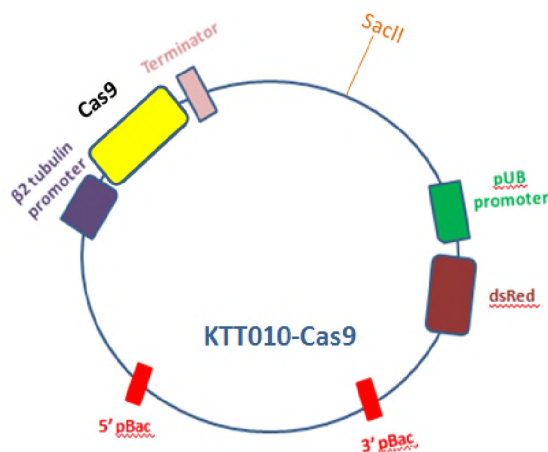


Εικόνα 4.3 Οι αλληλουχίες ενδιαφέροντος για την έκφραση του gRNA της Cpf1

4.2 Πειραματικά αποτελέσματα

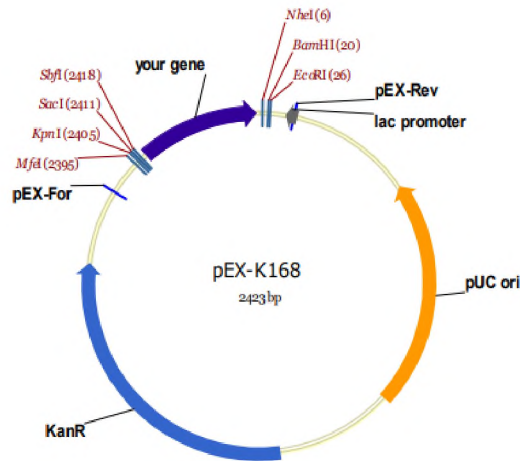
4.2.1 Cas9

Για τη δημιουργία του τελικού φορέα μετασχηματισμού riggyBac για την έκφραση της Cas9 και του gRNA της, χρησιμοποιήθηκε ο riggyBac φορέας KTT010-Cas9 (Tsoumani et al., unpublished data) και περιείχε ήδη υποκλωνοποιημένες τις εξής αλληλουχίες: την ενδονουκλεάση Cas9, μία θέση αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού SacII, όλα τα ρυθμιστικά στοιχεία για την έκφραση της Cas9, τον δείκτη μετασχηματισμού dsRed και όλες τις απαραίτητες αλληλουχίες για την ενσωμάτωση του φορέα στο γονιδίωμα του δάκου (Εικ. 4.4). Ο παραπάνω φορέας KTT010-Cas9 χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση της γενετικής κατασκευής που περιελάμβανε το sgRNA-scaffold και ρυθμιστικές του αλληλουχίες.



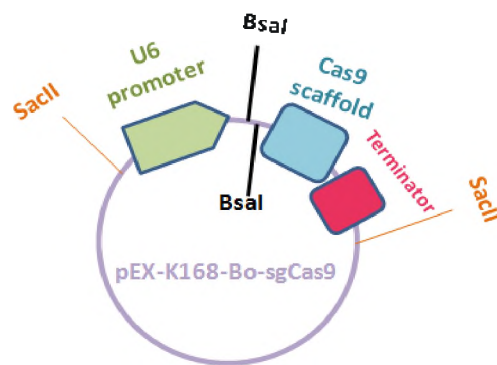
Εικόνα 4.4 Σχηματική απεικόνιση του φορέα pBackKTT010-Cas9

Οι αλληλουχίες που απαιτούνται για την έκφραση του gRNA της Cas9, συντέθηκαν συνθετικά και κλωνοποιήθηκαν στο πλασμίδιο pEX-K168 (Εικ. 4.5). Το τελικό πλασμίδιο pEX-K168-Bo-sgCas9 που δημιουργήθηκε, περιέχει διάφορες θέσεις αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού, μια ανεξάρτητη θέση αντιγραφής και ένα γονίδιο επιλογής το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη, φέρει επιπλέον τις επιθυμητές αλληλουχίες για την έκφραση του gRNA της Cas9.



Εικόνα 4.5 Το πλασμίδιο pEX-K168

Οι αλληλουχίες που ενσωματώθηκαν συνθετικά στο πλασμίδιο έχουν μέγεθος 589 bp και είναι οι εξής: ο υποκινητής U6P, δύο εν σειρά αντιπαράλληλες θέσεις αναγνώρισης BsaI, το scaffold για το gRNA της Cas9 και ο τερματιστής U6T (Εικ.4.6). Επιπλέον στα άκρα αυτού του τμήματος υπάρχουν δύο θέσεις αναγνώρισης του ενζύμου SacII αντίστοιχα. Οι θέσεις αναγνώρισης του SacII θα εξασφαλίσουν την κλωνοποίηση της κατασκευής στον φορέα pBac-KTT010-Cas9, ενώ οι δύο εν σειρά αντιπαράλληλες θέσεις αναγνώρισης του BsaI θα εξασφαλίσουν την ενσωμάτωση του gRNA.

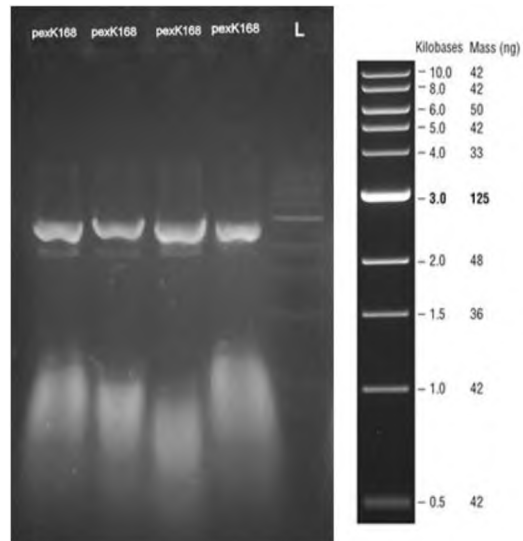


Εικόνα 4.6 Το πλασμίδιο pEX-K168-Bo-sgCas9

Το πλασμίδιο pEX-K168-Bo-sgCas9 χρησιμοποιήθηκε για τον χημικό μετασχηματισμό των κυττάρων DH5α (*E.coli*). Ακολούθησε η επίστρωση των μετασχηματισμένων κυττάρων σε τρυβλία στερεού θρεπτικού υλικού LB άγαρ που περιείχαν канаμυκίνη και στη συνέχεια υγρές καλλιέργειες επιλεγμένων αποικιών σε θρεπτικό υλικό LB broth παρουσία канаμυκίνης. Τέλος πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, το οποίο

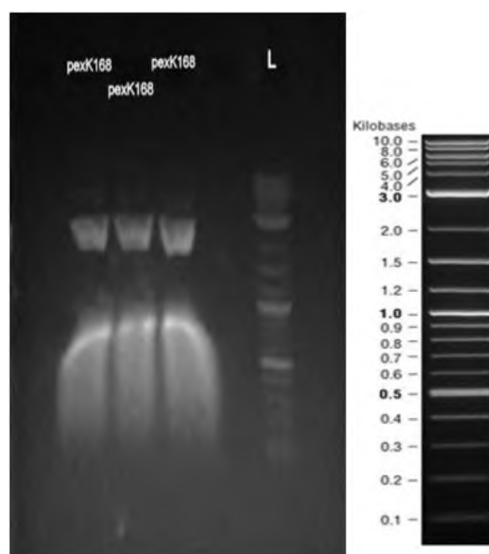
καθαρίστηκε με φαινόλη χλωροφόρμιο και ισοαμυλική αλκοόλη και αναδιαλύθηκε σε ddH₂O.

Για την επιβεβαίωση του κλωνοποιημένου τμήματος πραγματοποιήθηκε πέψη του πλασμιδίου με το ένζυμο περιορισμού EcoRI για γραμμοποίηση και πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση (Εικ. 4.7) επιβεβαιώνοντας το αναμενόμενο μέγεθος στις 3 kb.



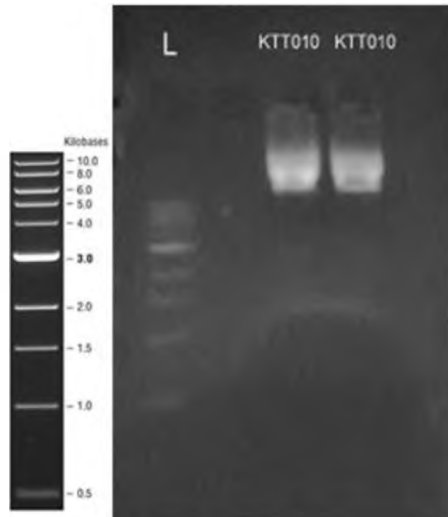
Εικόνα 4.7 Ηλεκτροφόρηση της πέψης του pEX-K168-Bo-sgCas9 με το EcoRI (1% agarose gel, TBE 0,5X, Ladder (L) : 1 kb DNA NEB)

Για την απομόνωση των επιθυμητών αλληλουχιών του συνθετικού πλασμιδίου πραγματοποιήθηκε πέψη του με το ένζυμο περιορισμού SacII. Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικ. 4.8) και προσδιορίστηκαν τα μεγέθη τους 2,5 kb και 0,5 kb αντίστοιχα. Το τμήμα μεγέθους 0,5 kb που αντιστοιχεί στις αλληλουχίες U6P-BsaI-Cas9-U6T ανακτήθηκε από το πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction) με χρήση του εμπορικού κιτ NucleoSpin Gel and PCR clean-up kit (Macherey-Nagel), ώστε να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω για την κλωνοποίησή του στον φορέα piggyBac-KTT010-Cas9.



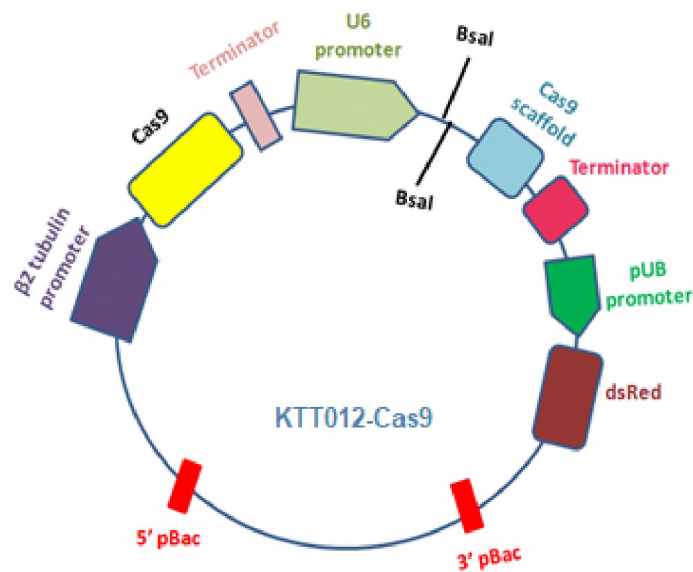
Εικόνα 4.8 Ηλεκτροφόρηση της πέψης του pEX-K168-Bo-sgCas9 με το SacII (1 % agarose gel, TBE 0,5X, Ladder (L): 1 kb plus NEB)

Το επόμενο βήμα ήταν η πέψη του φορέα riggyBac KTT010-Cas9 με το ένζυμο SacII για γραμμοποίηση. Μετά την γραμμοποίηση του φορέα pBacKTT010-Cas9 πραγματοποιήθηκε αποφωσφορυλίωση του φορέα με το ένζυμο TSAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase) και ακολούθως ηλεκτροφόρηση και ανάκτησή του.



Εικόνα 1.9 Ηλεκτροφόρηση της πέψης του KTT010-Cas9 με το SacII (1% agarose gel, TBE 0,5X, Ladder (L): 1 kb DNA NEB

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αντίδραση σύνδεσης (ligation) ανάμεσα στα ανακτημένα προϊόντα SacII-πέψης του φορέα KTT010-Cas9 και του ενθέματος Βο-U6P-BsaI-Cas9-U6T σε αναλογία 5:1 (φορέας: ένθεμα) και καταλύθηκε με το ένζυμο T4 λιγάση. Έπειτα έγινε κατακρήμνιση της αντίδρασης σύνδεσης και αναδιάλυση σε ddH₂O.



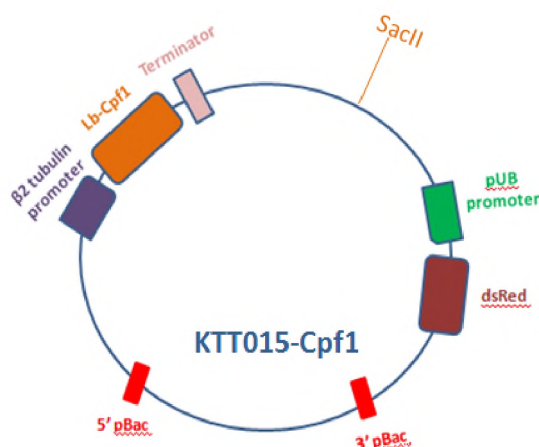
Εικόνα 4.10 Το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης pBacKTT012-Ca9-gRNA

Το προϊόν της αντίδρασης σύνδεσης, δηλαδή ο νέος φορέας (pBacKTT012-Cas9-gRNA) (Εικ.4.10) χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό κυττάρων *S. aureus*, τα οποία επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό υλικό LB-Broth αμπικιλίνης. Στη συνέχεια επιλεγμένες αποικίες από τις στερεές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες και ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, πέψη με SacII και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για την επιβεβαίωση της επιτυχούς κλωνοποίησης.

4.2.2 Cpf1

Για τη δημιουργία του τελικού φορέα μετασχηματισμού *riggyBac* για την έκφραση της Cpf1 και του gRNA της, χρησιμοποιήθηκε ο *riggyBac* φορέας KTT015-Cpf1 (Tsoumani et al., unpublished data). Ο φορέας KTT015-Cpf1 (Εικ. 4.11) περιείχε ήδη υποκλωνοποιημένες την ενδονουκλεάση Cpf1 και όλα τα ρυθμιστικά στοιχεία για την έκφρασή της, μία θέση αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού SacII, τον δείκτη μετασχηματισμού dsRed και όλες τις απαραίτητες αλληλουχίες για την ενσωμάτωση του φορέα στο γονιδίωμα του δάκου.

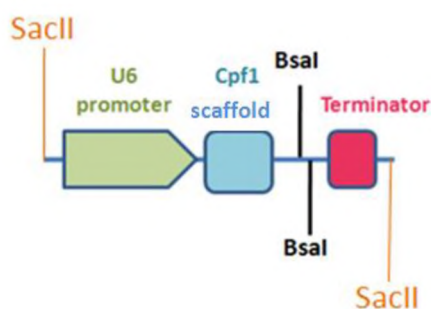
Ωστόσο στην περίπτωση αυτή, ακολουθήθηκε μια διαφορετική προσέγγιση από αυτή που περιγράφηκε παραπάνω στην ενότητα 4.2.1, λόγω της μη διαθεσιμότητας συνθετικών αλληλουχιών της κατασκευής για την έκφραση του gRNA της Cpf1. Εναλλακτικά, ο πειραματικός σχεδιασμός περιελάμβανε τη σταδιακή σύνθεση της κατασκευής ενισχύοντας διαδοχικά τις επιθυμητές αλληλουχίες μέσω PCR-προεξέχοντων άκρων (Overhang PCR).



Εικόνα 4.11 Σχηματική απεικόνιση του φορέα KTT015-Cpf1

Η *in silico* επεξεργασία των αλληλουχιών της κατασκευής πραγματοποιήθηκε στην πλατφόρμα Benchling. Οι αλληλουχίες ενδιαφέροντος συνολικού μήκους 531 bp

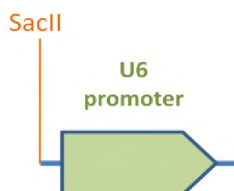
περιελάμβαναν την αλληλουχία του ομόλογου καθολικού υποκινητή Βο-U6P, την αλληλουχία του sgRNA-scaffold για την Cpf1, δύο εν σειρά αντιπαράλληλες θέσεις αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού BsaI και την αλληλουχία του τερματιστή (Εικ. 4.12). Στα άκρα αυτού του τμήματος υπάρχουν δύο θέσεις αναγνώρισης του ενζύμου SacII αντίστοιχα. Οι θέσεις αναγνώρισης του SacII θα εξασφαλίσουν την αποκοπή του τμήματος από το πλασμίδιο, ενώ οι δύο εν σειρά αντιπαράλληλες θέσεις αναγνώρισης του BsaI θα εξασφαλίσουν την ενσωμάτωση του gRNA.



Εικόνα 4.12 Σχηματική απεικόνιση κατασκευής για την έκφραση του gRNA της Cpf1

Σύμφωνα με αυτές τις αλληλουχίες σχεδιάστηκαν οι κατάλληλοι εκκινητές (βλ. Παράρτημα) και ακολούθησαν τέσσερις διαδοχικές αντιδράσεις ενίσχυσης μέσω Overhang PCR. Η αλληλουχία του υποκινητή Βο-U6P, απομονώθηκε έπειτα από PCR-ενίσχυση με τους κατάλληλους εκκινητές χρησιμοποιώντας ως μήτρα το πλασμίδιο pEX-K168-Bo-sgCas9 που χρησιμοποιήθηκε για την Cas9. Οι υπόλοιπες αλληλουχίες προστέθηκαν διαδοχικά μέσω των προεξέχοντων άκρων των εκκινητών, ώστε μετά από κάθε PCR να αυξάνεται το μήκος της κατασκευής. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με το IDT Primer Quest Tool και ελέγχθηκαν για τη διαμόρφωση τους και την μη δημιουργία διμερών με το εργαλείο OligoAnalyzer Tool.

Συγκεκριμένα κατά την πρώτη Overhang PCR (PCR-1) (Εικ. 4.13) με μήτρα το pEX-K168-Bo-sgCas9 που περιέχει τον υποκινητή U6P, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές U6P-F και U6P-R1. Ο εκκινητής U6P-F έχει προεξέχον άκρο και πρόσθεσε στο 5' άκρο της αλληλουχίας U6P μια θέση αναγνώρισης SacII με το τελικό μήκος του προϊόντος να είναι 475 bp.

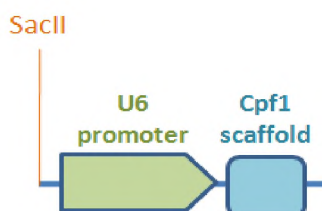


Εικόνα 4.13 Σχηματική απεικόνιση του προϊόντος της PCR-1

Η PCR-1 ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης, επιβεβαιώθηκε το μέγεθος της σύμφωνα με το σχεδιασμό και ακολούθησε η ανάκτηση και ο καθαρισμός (gel extraction) του

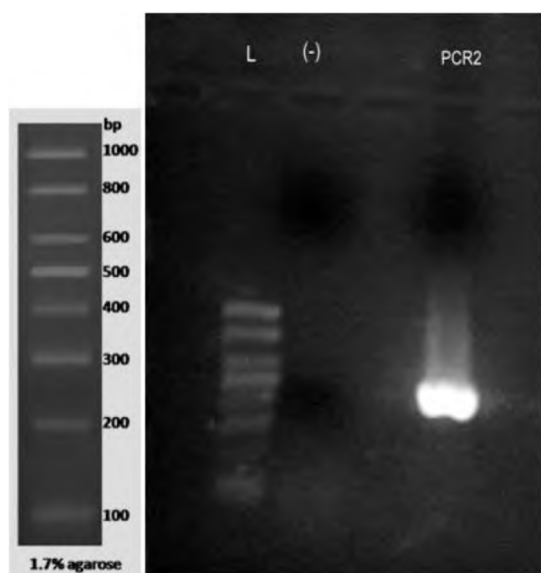
προϊόντος και ο καθαρισμός του DNA με τη χρήση του NucleoSprin Gel and PCR clean-up kit (Macherey-Nagel).

Στη δεύτερη Overhang PCR (PCR-2) (Εικ. 4.14) χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα το προϊόν της προηγούμενης PCR-1 και οι εκκινητές U6P-F και R2-U6P-Cpf1. Ο τελευταίος έχει σχεδιαστεί ώστε στο προεξέχον άκρο του να φέρει την αλληλουχία του sgRNA-scaffold της Cpf1. Το προϊόν ενίσχυσης με χρήση των παραπάνω εκκινητών έχει πλέον μέγεθος 498 bp.



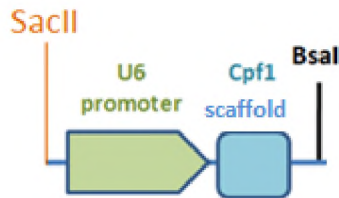
Εικόνα 4.14 Σχηματική απεικόνιση του προϊόντος της PCR-2

Το προϊόν της PCR επιβεβαιώθηκε σε ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης (Εικ.4.15) και ακολούθως ανακτήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε ώστε να αποτελέσει τη μήτρα της επόμενης PCR-3.

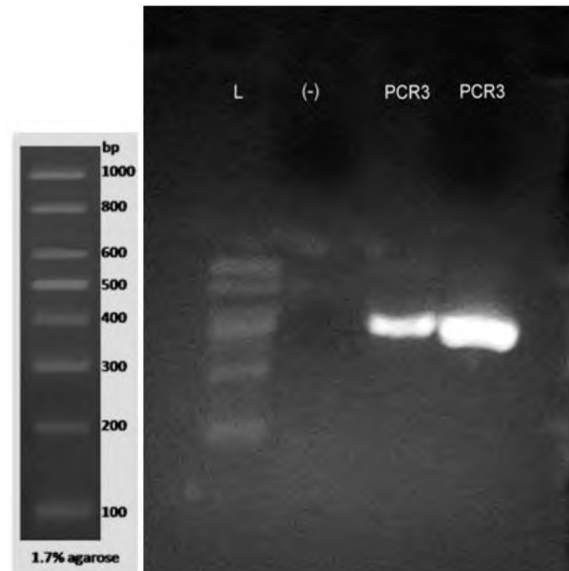


Εικόνα 4.15 Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR-2 (1,2 % agarose gel, TBE 0,5X, Ladder (L): Minotech 100 bp. Συγέντρωση του προϊόντος έπειτα από ανάκτηση: 31,4 ng/μl. (1

Στην PCR-3 (4.16) χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές U6P-F και R3-Cpf1-BsaI, μέσω του οποίου ήταν εφικτή η προσθήκη μίας εκ των δύο διαδοχικών και αντιπαράλληλων θέσεων αναγνώρισης του ενζύμου BsaI, με αποτέλεσμα το μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης να είναι πλέον 505 bp.

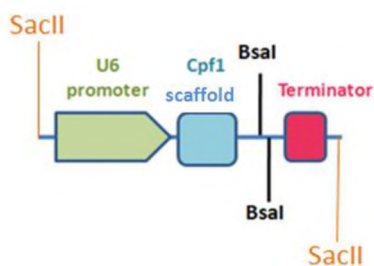


Εικόνα 4.16 Σχηματική απεικόνιση του προϊόντος της PCR-3

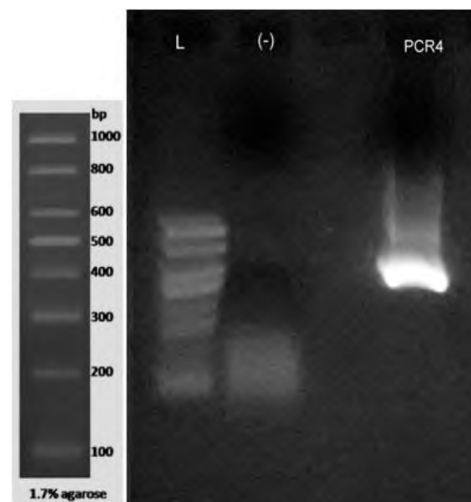


Εικόνα 4.17 Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR-3 (1,2% agarose gel, TBE 0,5X, Ladder (L): Minotech 100 bp. Συγκέντρωση: 20 ng/μl)

Η κατασκευή ολοκληρώθηκε με την τελευταία Overhang PCR-4 (Εικ. 4.18). Μέσω της αντίδρασης αυτής προστέθηκε το τελευταίο τμήμα της κατασκευής με χρήση των εκκινητών U6P-F και R4-BsaI-U6T-SacII (Εικ. 4.18). Με τον συγκεκριμένο εκκινητή ήταν εφικτή η προσθήκη της δεύτερης εκ των δύο διαδοχικών και αντιπαράλληλων θέσεων αναγνώρισης του ενζύμου BsaI, του τερματιστή U6T και μία θέση αναγνώρισης του ενζύμου SacII με αποτέλεσμα το μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης να είναι πλέον 531 bp.

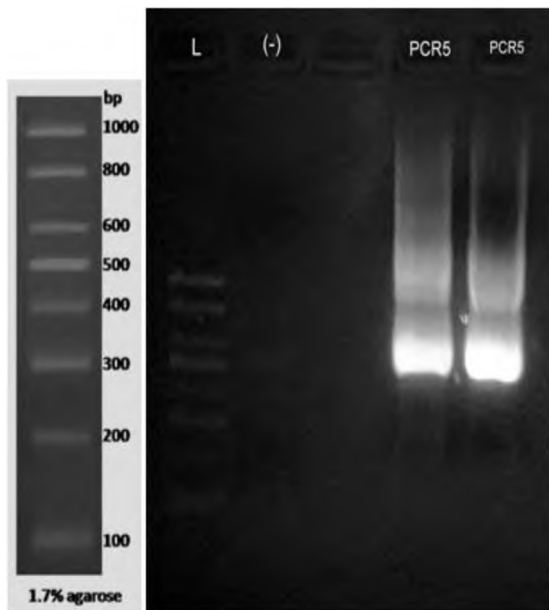


4.18 Σχηματική απεικόνιση του προϊόντος της PCR-4



Εικόνα 4.19 Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR-4 (1,2 % agarose gel, TBE 0,5X, Ladder (L): Minotech 100 bp. Συγκέντρωση: 14,4 ng/μl)

Τελικά, για την απομόνωση ικανής ποσότητας της κατασκευής που δημιουργήθηκε μέσω των Overhang PCR με σκοπό την κλωνοποίησή της στον φορέα ρBac-KTT-015 πραγματοποιήθηκε και μια απλή PCR (PCR-5) χρησιμοποιώντας τους εκκινητές: U6P-F και U6T-Bo-Cpf1-R. Το προϊόν της PCR-5 αλληλουχίστηκε με τον εκκινητή U6P-F, και επιβεβαιώθηκε η επιτυχής οργάνωση της γενετικής κατασκευής για την έκφραση του sgRNA της Cpf1.



Εικόνα 4.20 Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR-5 (1,2% agarose gel, TBE 0,5X, Ladder (L): Minotech 100 bp. Συγκέντρωση: 19,5 ng/μl

5. Συζήτηση

Ο δάκος, *Bactrocera oleae*, αποτελεί το σημαντικότερο παράσιτο της ελιάς. Η διαχείρισή του πραγματοποιείται με εντομοκτόνα τα οποία όχι μόνο είναι αναποτελεσματικά αλλά ακόμη προκαλούν σημαντικές επιπτώσεις στο περιβάλλον, τα οικοσυστήματα και τη δημόσια υγεία. Οπότε είναι αναγκαία η ανάπτυξη τεχνικών ελέγχου οι οποίες είναι φιλικές προς το περιβάλλον και έχουν την απαραίτητη εξειδίκευση στο δάκο. Η ανάπτυξη μεθόδων γενετικού ελέγχου που παρεμβαίνουν στο μηχανισμό φυλοκαθορισμού υπέρ των αρσενικών, αποτελεί μια αρκετά υποσχόμενη εναλλακτική λύση. Μία τέτοια μέθοδος είναι το σύστημα τεμαχισμού του Χ χρωμοσώματος, X-shredding, η οποία στοχεύει να διαταράξει την αναλογία των θηλυκών και των αρσενικών απογόνων υπέρ των αρσενικών, να δημιουργήσει πλεόνασμα αρσενικών ατόμων και κατά συνέπεια την μείωση του πληθυσμού λόγω έλλειψης θηλυκών (Windbichler et al., 2008; Galizi et al., 2014). Για να επιτευχθεί αυτό πρέπει να δημιουργηθούν γενετικά τροποποιημένα άτομα που θα εκφράζουν κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης μια ενδονουκλεάση που θα τέμνει ειδικές μικρές και επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του Χ χρωμοσώματος. Σε αυτή την προσπάθεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι ενδονουκλεάσες του συστήματος CRISPR. Επιτυχημένες εφαρμογές του X-shredding έχουν ήδη αναφερθεί σε διάφορα έντομα όπως το *Anopheles gambiae* (Galizi et al., 2016) και η *Ceratitis capitata* (Meccariello et al., 2021).

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν ο σχεδιασμός και η δημιουργία των κατάλληλων γενετικών κατασκευών, ώστε η χρήση τους να επιτρέψει την εφαρμογή του συστήματος X-shredding στο δάκο της ελιάς. Συγκεκριμένα δημιουργήθηκαν δύο κατασκευές ειδικές για τις RNA-καθοδηγούμενες ενδονουκλεάσες Cas9 και Cpf1 αντίστοιχα. Και οι δύο κατασκευές φέρουν τα σταθερά τμήματα (scaffold) του sgRNA για την Cas9 και τη Cpf1 αντίστοιχα, ώστε να μπορούν να κλωνοποιηθούν σε αυτά τα κατάλληλα sgRNA έναντι των αλληλουχιών-στόχων.

Η ενδονουκλεάση Cas9 αποτελεί την πιο συνήθη και ασφαλή επιλογή για την ανάπτυξη του συστήματος X-shredding, αφού αποτελεί την πιο μελετημένη ενδονουκλεάση του συστήματος CRISPR και με τη χρήση της έχει επιτυχώς προκληθεί τεμαχισμός του χρωμοσώματος Χ και σε άλλα έντομα. Η επιλογή να δημιουργηθεί ακόμη ένας φορέας αξιοποιώντας την ενδονουκλεάση Cpf1 έγκειται στο γεγονός πως με βάση τη βιβλιογραφία (Moreno-Mateos et al., 2017) η λειτουργία της Cpf1 εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Αυτό το χαρακτηριστικό δίνει τη δυνατότητα ελέγχου της δράσης της ενδονουκλεάσης με βάση τη θερμοκρασία. Δηλαδή το σύστημα αυτό θα λειτουργεί επιπλέον ως ένας διακόπτης “on-off” ώστε στις διαγονιδιακές μύγες που θα φέρουν τη συγκεκριμένη κατασκευή να ελέγχεται η ενεργότητα της ενδονουκλεάσης ανάλογα με τη θερμοκρασία. Έτσι η λειτουργία του συστήματος X-shredding θα μπορεί να ελεγχθεί χρονικά με βάση τις εκάστοτε ανάγκες της μαζικής εκτροφής των εντόμων.

Οι αλληλουχίες που περιέχονται στις τελικές κατασκευές είναι η ενδονουκλεάση, το σταθερό τμήμα του gRNA (scaffold), ο δείκτης dsRed, όλες οι ρυθμιστικές αλληλουχίες αυτών των στοιχείων και τα άκρα 5' και 3' riggyBac για την ένθεση της συνολικής

κατασκευής στο γονιδίωμα του δάκου. Για την έκφραση της ενδονουκλεάσης χρησιμοποιήθηκε ο υποκινητής της β2-τουμπουλίνης, ο οποίος ενεργοποιείται μόνο κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, για την έκφραση του gRNA χρησιμοποιήθηκε ο υποκινητής U6P ο οποίος είναι ιδιοσυστάτα ενεργός και για τον δείκτη dsRed ο υποκινητής της ουβικιτίνης. Οι δύο ενδονουκλεάσες διαφέρουν στον τρόπο που αναγνωρίζουν και τέμνουν το DNA-στόχο και απαιτούν gRNA με ξεχωριστά χαρακτηριστικά το καθένα, τα οποία ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των ενδονουκλεασών. Οπότε οι τελικές κατασκευές διαφέρουν μόνο στην ενδονουκλεάση που περιέχουν και στην αλληλουχία του gRNA.

Η αλληλουχία του gRNA που περιλαμβάνεται σε κάθε κατασκευή αντιπροσωπεύει το σταθερό τμήμα crRNA που απαιτείται για τη δημιουργία της δευτεροταγούς δομής του gRNA που αναγνωρίζεται από τη δεδομένη ενδονουκλεάση. Το μεταβλητό τμήμα αποτελεί την αλληλουχία του spacer και είναι αυτό που αναγνωρίζει την αλληλουχία του DNA-στόχου και είναι συμπληρωματικό με αυτό. Ο σχεδιασμός των φορέων περιελάμβανε στην επιμέρους κατασκευή του sgRNA την αλληλουχία μόνο της περιοχής του σταθερού τμήματος (scaffold) και ανοδικά (Cas9) ή καθοδικά (Cpf1) αυτής δύο εν σειρά και αντιπαράλληλες θέσεις αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού BsaI.

Οι θέσεις αυτές δίνουν τη δυνατότητα της ένθεσης του μεταβλητού τμήματος του gRNA δηλαδή της αλληλουχίας στόχου χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Golden Gate. Το ένζυμο BsaI ανήκει στην κατηγορία του τύπου IIS και κόβει έξω από τη θέση αναγνώρισης και δημιουργεί κολλώδη άκρα. Μετά την πέψη η θέση αναγνώρισης παύει να υπάρχει για αυτό στη Golden Gate κλωνοποίηση η πέψη και η αντίδραση λιγάσης γίνεται ταυτόχρονα στην ίδια αντίδραση. Η επιλογή αυτής της μεθόδου εξασφαλίζει ότι το αποτέλεσμα της αντίδρασης της λιγάσης είναι εξαιρετικά αποτελεσματικό και μη αντιστρεπτό. Ο σχεδιασμός αυτός επιτρέπει να χρησιμοποιείται ο συγκεκριμένος φορέας για διαφορετικούς στόχους, κλωνοποιώντας κάθε φορά την επιθυμητή αλληλουχία του μεταβλητού τμήματος gRNA.

Η κατασκευή του τελικού φορέα για την Cas9 ολοκληρώθηκε με επιτυχία και μπορεί περαιτέρω να χρησιμοποιηθεί για την υποκλωνοποίηση του επιθυμητού sgRNA. Όσον αφορά τον τελικό φορέα για την Cpf1, ολοκληρώθηκε η κατασκευή που θα εξασφαλίζει την έκφραση του gRNA, ώστε ακολούθως αυτή να κλωνοποιηθεί στον φορέα piggycas που φέρει την ενδονουκλεάση Cpf1 και τον δείκτη μετασχηματισμού. Η κλωνοποίηση μπορεί να επιτευχθεί είτε χρησιμοποιώντας απευθείας το PCR-προϊόν είτε μετά από υποκλωνοποίηση του PCR-προϊόντος σε πλασμιδιακό φορέα.

Για τη χρήση του τελικού φορέα που δημιουργήθηκε στο σύστημα X-shredding απαιτείται το μεταβλητό τμήμα του sgRNA να αναγνωρίζει συμπληρωματικά μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία που εντοπίζεται αποκλειστικά στο X χρωμόσωμα. Η εύρεση και η επιλογή των κατάλληλων gRNA για κάθε μια από τις διαφορετικές ενδονουκλεάσες Cas9 και Cpf1 θα γίνει με το εργαλείο του Redkmer. Κάθε αλληλουχία kmer που θα προκύψει από την ανάλυση αυτή θα αποτελεί το μεταβλητό τμήμα του gRNA.

Μελλοντικές προσπάθειες θα εστιάσουν στην κλωνοποίηση του κατάλληλου gRNA που θα συντεθεί ως συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο στον τελικό φορέα piggycas που δημιουργήθηκε

από την παρούσα εργασία. Ακολούθως, ο τελικός αυτός φορέας, μαζί με ένα βοηθητικό πλασμίδιο που θα κωδικοποιεί το ένζυμο της τρανσποζάσης, θα μπορεί να εντεθεί μέσω μικροενέσεων σε έμβρυα δάκου, με σκοπό τη δημιουργία αρσενικών διαγονιδιακών μυγών. Παρατήρηση των εντόμων μετά τις μικροενέσεις κάτω από κατάλληλο φίλτρο για το γονίδιο-δείκτη (dsRed), θα υποδείξει τον επιτυχή γενετικό μετασχηματισμό.

Μελλοντικές βελτιώσεις για το σύστημα X-shredding

Η απόδοση του συστήματος X-shredding που θα αναπτυχθεί, σύμφωνα με αναλύθηκαν παραπάνω θα εξαρτηθεί σε μεγάλο βαθμό από την επιλογή των αλληλουχιών-στόχων και την αποτελεσματική ρύθμιση της έκφρασής του. Συνεπώς ενδέχεται μελλοντικά να απαιτηθούν βελτιώσεις ώστε να επιτευχθούν όσο το δυνατόν υψηλότερα επίπεδα παραμόρφωσης της αναλογίας φύλου. Μια βελτίωση του συστήματος είναι η ταυτόχρονη στόχευση παραπάνω από μία αλληλουχίας στο X χρωμόσωμα μέσω της διαδικασίας multiplex. Η στόχευση πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας περισσότερα του ενός gRNAs, τα οποία εκφράζονται από την ίδια κατασκευή και υπό τον έλεγχο του ίδιου υποκινητή. Μια τέτοια προσέγγιση αναμένεται να οδηγήσει σε αποτελεσματικότερο κατακερματισμό του X χρωμοσώματος.

Μια δεύτερη βελτίωση είναι η ενσωμάτωση της κατασκευής στο χρωμόσωμα Y, δηλαδή η δημιουργία ενός gene drive. Ένα gene drive συνιστά έναν μηχανισμό ο οποίος ξεπερνά τους παραδοσιακούς νόμους του Mendel όσον αφορά τη γενετική κληρονομία. Η κληρονομία του χαρακτηριστικού παραμορφώνεται και αυξάνεται σε έναν πληθυσμό παρά την αρνητική επίδραση που μπορεί να έχει στη φυσική κατάσταση του εντόμου. Επομένως η κληρονομία της κατασκευής γίνεται σε όλους τους αρσενικούς απόγονους, ακόμη και αν η αρχική απελευθέρωση των διαγονιδιακών ατόμων είναι μικρή, το χαρακτηριστικό συνεχίζει να παραμένει στον πληθυσμό και τελικά μπορεί να τον καταστείλει καθώς η κατασκευή είναι αυτοσυντηρούμενη. Ωστόσο, η εισαγωγή της κατασκευής στο Y χρωμόσωμα αποτελεί πρόκληση λόγω της ετεροχρωματινικής του φύσης καθώς περιέχει πολλές επαναλήψεις και είναι σε μεγάλο βαθμό σε καταστολή κατά τη διάρκεια της μείωσης.

6. Παράρτημα

- **Χαρακτηριστικά εκκινητών PCR**

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του τμήματος **SacII-U6P-Cpf1scaffold-BsaI-U6T-SacII**.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	T _m	Μέγεθος αναμενόμενου προϊόντος
U6P-F	CCGCGGGTGTAACATGTATGT	60,3 °C	-
U6P-R1	GAATTTATGCCATTTTAGTTGGTACT	58,2 °C	475 bp
R2-U6P-Cpf1	ATCTACACTTAGTAGAAATTACCGAATTTATGCCATTTTAGTT	65,6 °C	498 bp
R3-Cpf1-BsaI	GGTCTCAATCTACACTTAGTAGAAATTA	59,3 °C	505 bp
R4-Bsa-U6T-SacII	CCGCGGAAAAAAAATAAGAGACCAGAGGTCTCAATCTACA	70,5 °C	531 bp
U6T-Bo-Cpf1-R	CCGCGGAAAAAAAATAAGAGACC	61,3 °C	531 bp

- **Υλικά και Μέθοδοι**

Για την προετοιμασία του LB broth

Για 50 ml:

1. Μέτρηση 1,25 gr σκόνη LB broth και τοποθέτηση σε αποστειρωμένο μπουκάλι.
2. Προσθήκη 50 ml H₂O και ελαφριά ανακίνηση.
3. Τοποθέτηση του διαλύματος στην αποστείρωση.

Για relaxed plasmids η προτεινόμενη συγκέντρωση του αντιβιοτικού είναι 50μg/ml

4. Προσθήκη 250 μl καναμυκίνη (10 mg/ml) μετά την αποστείρωση.

Για την προετοιμασία τρυβλίων LB άγαρ με καναμυκίνη

Για 150 ml:

1. Μέτρηση 5,25 gr σκόνη LB agar και τοποθέτηση σε αποστειρωμένο μπουκάλι.
2. Προσθήκη 150 ml H₂O και ανακίνηση.
3. Τοποθέτηση του διαλύματος στην αποστείρωση.

Για relaxed plasmids η συγκέντρωση του αντιβιοτικού είναι 50μg/ml

4. Προσθήκη 750 μl καναμυκίνη (10mg/ml) και ανακίνηση.
5. Στρώσιμο των τρυβλίων.
6. Τοποθέτηση των τρυβλίων ανάποδα και τύλιγμα με μεμβράνη.

7. Βιβλιογραφία

- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, *315*(5819), 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- Burt, A. (2003). Site-specific selfish genes as tools for the control and genetic engineering of natural populations. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *270*(1518), 921–928. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2319>
- Catteruccia, F., Benton, J. P., & Crisanti, A. (2005). An Anopheles transgenic sexing strain for vector control. *Nature Biotechnology*, *23*(11), 1414–1417. <https://doi.org/10.1038/nbt1152>
- Daane, K. M., & Johnson, M. W. (2010). Olive fruit fly: managing an ancient pest in modern times. *Annual Review of Entomology*, *55*, 151–169. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090553>
- Deredec, A., Burt, A., & Godfray, H. C. J. (2008). The Population Genetics of Using Homing Endonuclease Genes in Vector and Pest Management. *Genetics*, *179*(4), 2013–2026. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.089037>
- Deredec, A., Godfray, H. C. J., & Burt, A. (2011). Requirements for effective malaria control with homing endonuclease genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(43), E874–E880. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110717108>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, *346*(6213), 1258096–1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Fletcher, B. S. (1987). The Biology of Dacine Fruit Flies. *Annual Review of Entomology*, *32*(1), 115–144. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.32.010187.000555>
- Fraser, M. J. (2000). *The TTAA-specific family of transposable elements: Identification, functional, characterization and utility for transformation of insects. In Insect Transgenesis: Methods and Applications, A. M. Handler and A. A. James, eds. (Boca Raton: CRC Press), pp. 249-268.*
- Fu, G., Condon, K. C., Epton, M. J., Gong, P., Jin, L., Condon, G. C., Morrison, N. I., Dafa'alla, T. H., & Alphey, L. (2007). Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing. *Nature Biotechnology*, *25*(3), 353–357. <https://doi.org/10.1038/nbt1283>
- Galizi, R., Doyle, L. A., Menichelli, M., Bernardini, F., Deredec, A., Burt, A., Stoddard, B. L., Windbichler, N., & Crisanti, A. (2014). A synthetic sex ratio distortion system for the control of the human malaria mosquito. *Nature Communications*, *5*(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms4977>
- Galizi, R., Hammond, A., Kyrou, K., Taxiarchi, C., Bernardini, F., O'Loughlin, S. M., Papathanos, P.-A., Nolan, T., Windbichler, N., & Crisanti, A. (2016). A CRISPR-Cas9

- sex-ratio distortion system for genetic control. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep31139>
- Gould, F., & Schliekelman, P. (2004). POPULATION GENETICS OF AUTOCIDAL CONTROL AND STRAIN REPLACEMENT. *Annual Review of Entomology*, 49(1), 193–217. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123344>
- Hamilton, W. D. (1967). Extraordinary Sex Ratios. *Science*, 156(3774), 477–488. <https://doi.org/10.1126/science.156.3774.477>
- Ishino, Y., Krupovic, M., & Forterre, P. (2018). History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *Journal of Bacteriology*, 200(7), e00580-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00580-17>
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5429–5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Knipling, E. F. (1955). Possibilities of Insect Control or Eradication Through the Use of Sexually Sterile Males. *Journal of Economic Entomology*, 48(4), 459–462. <https://doi.org/10.1093/jee/48.4.459>
- Lampe, D. J., Walden, K. K. O., Sherwood, J. M., & Robertson, H. M. (2000). *Genetic engineering of insects with mariner transposons*. Insect Transgenesis.
- Loukeris, T. G., Livadaras, I., Arc, B., Zabalou, S., & Savakis, C. (1995). Gene Transfer into the Medfly, *Ceratitis capitata*, with a *Drosophila hydei* Transposable Element. *Science*, 270(5244), 2002–2005. <https://doi.org/10.1126/science.270.5244.2002>
- Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Wolf, Y. I., Yakunin, A. F., van der Oost, J., & Koonin, E. V. (2011). Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6), 467–477. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2577>
- Mohammadzadeh, I., Qujeq, D., Yousefi, T., Ferns, G. A., Maniati, M., & Vaghari-Tabari, M. (2020). CRISPR /Cas9 gene editing: A new therapeutic approach in the treatment of infection and autoimmunity. *IUBMB Life*. <https://doi.org/10.1002/iub.2296>
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), 174–182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- Moreno-Mateos, M. A., Fernandez, J. P., Rouet, R., Vejnar, C. E., Lane, M. A., Mis, E., Khokha, M. K., Doudna, J. A., & Giraldez, A. J. (2017). CRISPR-Cpf1 mediates efficient homology-directed repair and temperature-controlled genome editing. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01836-2>

- Nakade, S., Yamamoto, T., & Sakuma, T. (2017). Cas9, Cpf1 and C2c1/2/3—What's next? *Bioengineered*, *8*(3), 265–273. <https://doi.org/10.1080/21655979.2017.1282018>
- Nardi, F., Dreassi, E., Romano Dallai, Roderick, G. K., & Frati, F. (2005). Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology*, *14*(9), 2729–2738. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2005.02610.x>
- Newton, M. E., Wood, R. J., & Southern, D. I. (1976). A cytogenetic analysis of meiotic drive in the mosquito, *Aedes aegypti* (L.). *Genetica*, *46*(3), 297–318. <https://doi.org/10.1007/bf00055473>
- O'Brochta, D. A., Warren, W. D., Saville, K. J., & Atkinson, P. W. (1996). Hermes, a Functional Non-Drosophilid Insect Gene Vector From *Musca domestica*. *Genetics*, *142*(3), 907–914. <https://doi.org/10.1093/genetics/142.3.907>
- Papathanos, P. A., & Windbichler, N. (2018). Redkmer: An Assembly-Free Pipeline for the Identification of Abundant and Specific X-Chromosome Target Sequences for X-Shredding by CRISPR Endonucleases. *The CRISPR Journal*, *1*(1), 88–98. <https://doi.org/10.1089/crispr.2017.0012>
- Pontikakos, C. M., Tsiligiridis, T. A., Yialouris, C. P., & Kontodimas, D. C. (2012). Pest management control of olive fruit fly (*Bactrocera oleae*) based on a location-aware agro-environmental system. *Computers and Electronics in Agriculture*, *87*, 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2012.05.001>
- Robinson, A. S. (1983). Sex-Ratio Manipulation in Relation to Insect Pest Control. *Annual Review of Genetics*, *17*(1), 191–214. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.17.120183.001203>
- Rubin, G., & Spradling, A. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science*, *218*(4570), 348–353. <https://doi.org/10.1126/science.6289436>
- Safari, F., Zare, K., Negahdaripour, M., Barekati-Mowahed, M., & Ghasemi, Y. (2019). CRISPR Cpf1 proteins: structure, function and implications for genome editing. *Cell & Bioscience*, *9*(1). <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0298-7>
- Sapranaukas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, *39*(21), 9275–9282. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr606>
- Schliekelman, P., Ellner, S., & Gould, F. (2005). Pest Control by Genetic Manipulation of Sex Ratio. *Journal of Economic Entomology*, *98*(1), 18–34. <https://doi.org/10.1093/jee/98.1.18>
- Skouras, P. J., Margaritopoulos, J. T., Seraphides, N. A., Ioannides, I. M., Kakani, E. G., Mathiopoulos, K. D., & Tsitsipis, J. A. (2006). Organophosphate resistance in olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, populations in Greece and Cyprus. *Pest Management Science*, *63*(1), 42–48. <https://doi.org/10.1002/ps.1306>

- Swarts, D. C., & Jinek, M. (2018). Cas9 versus Cas12a/Cpf1: Structure-function comparisons and implications for genome editing. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 9(5), e1481. <https://doi.org/10.1002/wrna.1481>
- Sweeny, T. L., & Barr, A. R. (1978). SEX RATIO DISTORTION CAUSED BY MEIOTIC DRIVE IN A MOSQUITO, *Culex pipiens* L. *Genetics*, 88(3), 427–446. <https://doi.org/10.1093/genetics/88.3.427>
- Thomas, D. D. (2000). Insect Population Control Using a Dominant, Repressible, Lethal Genetic System. *Science*, 287(5462), 2474–2476. <https://doi.org/10.1126/science.287.5462.2474>
- Tsoumani, K. T., Meccariello, A., Mathiopoulos, K. D., & Papathanos, P. A. (2019). Developing CRISPR-based sex-ratio distorters for the genetic control of fruit fly pests: A how to manual. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 103(3). <https://doi.org/10.1002/arch.21652>
- Tzanakakis, M. (2003). SEASONAL DEVELOPMENT AND DORMANCY OF INSECTS AND MITES FEEDING ON OLIVE: A REVIEW. *Netherlands Journal of Zoology*, 52(2), 87–224. <https://doi.org/10.1163/156854203764817670>
- Whitten, M. J. (1985). *The conceptual basis for genetic control*. *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology* 12: 465–528.
- Windbichler, N., Papathanos, P. A., & Crisanti, A. (2008). Targeting the X Chromosome during Spermatogenesis Induces Y Chromosome Transmission Ratio Distortion and Early Dominant Embryo Lethality in *Anopheles gambiae*. *PLoS Genetics*, 4(12), e1000291. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000291>
- Zetsche, B., Gootenberg, Jonathan S., Abudayyeh, Omar O., Slaymaker, Ian M., Makarova, Kira S., Essletzbichler, P., Volz, Sara E., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., Koonin, Eugene V., & Zhang, F. (2015). Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell*, 163(3), 759–771. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>